



<https://aislamientocromosomicosoleasenegalensis.wordpress.com/>



---

***Título: Aislamiento de cromosomas del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) mediante técnicas de microdissección láser.***

---

Facultad de Ciencias.

Grado en Biotecnología.

Curso 2014/2015

***Autor: Sergio Linares Fernández.***

Tutores: Laureana Rebordinos González y Manuel Alejandro Merlo Torres



## ÍNDICE

1	Resumen y Abstract.....	1
1.1	Resumen.....	1
1.2	Abstract. ....	2
2	Introducción .....	3
2.1	Características de Solea Senegalensis .....	3
2.1.1	Taxonomía .....	3
2.1.2	Características biológicas .....	3
2.1.3	Ciclo biológico.....	4
2.1.4	Acuicultura del lenguado.....	5
2.1.5	Interés en pesca y acuicultura .....	6
2.2	Técnicas citogenéticas y moleculares.....	7
2.2.1	Citogenética.....	7
2.2.2	Otras técnicas moleculares: Microdissección y DOP-PCR.....	9
2.2.3	Antecedentes .....	10
3	Objetivos .....	12
4	Solución Técnica/Resultados.....	13
4.1	Material y Métodos.....	13
4.1.1	Preparaciones cromosómicas.....	13
4.1.2	Microdissección láser.....	21
4.1.3	DOP-PCR .....	22
4.2	Resultados y discusión.....	29
4.2.1	Preparaciones cromosómicas.....	29
4.2.2	Microdissección con láser .....	33
4.2.3	DOP-PCR .....	38

4.2.4	Optimización del tiempo .....	41
5	Conclusiones.....	44
6	Perspectivas futuras del TFG .....	45
7	Bibliografía.....	46
8	Apéndices. ....	50
8.1	Abreviaturas. ....	50
8.2	Contenido Multimedia .....	51

# 1 Resumen y Abstract.

## 1.1 Resumen.

El lenguado senegalés (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) es un pez plano, asimétrico y ovalado que vive en el fondo marino de la costa atlántica y mediterránea del suroeste de Europa y noroeste de África.

El interés en la producción de *Solea senegalensis* se ha incrementado, ya que es una especie muy cotizada por el mercado europeo. Este interés ha dado lugar a la puesta a punto de su producción en acuicultura, asimismo ha desencadenado en los últimos años un aumento en la investigación de las bases genéticas de la especie: identificación y secuenciación de genes, realización de mapas físicos, mapas citogenéticos, para así aplicarlo a programas de mejora.

Todo esto se está desarrollando gracias a técnicas como la secuenciación de nueva generación (NGS), que permite conocer la secuencia de ADN, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para amplificar secuencias de ADN, la Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH) para poder localizar físicamente en un cromosoma una secuencia marcada, la microdissección que es de utilidad para poder aislar cromosomas determinados y la DOP-PCR una técnica molecular que permite amplificar grandes regiones de ADN sin necesidad de conocer la secuencia y que, posteriormente, permite marcar el producto de DOP-PCR generado para la realización del pintado cromosómico mediante FISH.

Por tanto, la puesta a punto de estas técnicas en el lenguado senegalés es necesaria para obtener mejores resultados en investigación. El presente trabajo se centró en la mejora de algunas técnicas, especialmente se centró en la extensión de las preparaciones cromosómicas, para continuar con la optimización de la técnica de microdissección láser y DOP-PCR a partir del material microdisseccionado.

El proceso de optimización de las técnicas se basó en tres partes. En primer lugar se realizó la mejora de la técnica para la obtención de placas metafásicas variando las condiciones y protocolos de extensión. Primero se realizó en portaobjetos de vidrios convencionales y segundo en portaobjetos especiales para microdissección con una membrana de Tereftalato de polietileno (PET). Se continuó con la mejora de la técnica y condiciones para la microdissección láser del microscopio implementando una metodología de corte y ajuste de los parámetros de corte como la energía, la velocidad, el número de ciclos de corte, el enfoque del corte y el catapultado o lanzamiento de la

sección cortada con un impulso láser a un tubo de PCR. Por último, se continuó con la mejora de las condiciones de la DOP-PCR. Se Utilizaron dos tipos de polimerasa, una termosensible y otra termolábil, cada una con su procedimiento. Además se ajustó la cantidad de cromosomas necesarios para una amplificación satisfactoria.

## 1.2 Abstract.

*Solea senegalensis*, Kaup 1858 is a flatfish, asymmetrical and oval that lives in the sea bottom of the Atlantic and Mediterranean coast of southwestern Europe and northwestern Africa.

The interest in the production of *Solea senegalensis* has increased because it is a highly prized species by european market, the production in this region has increased in recent years. This interest has developed the aquaculture production and the growing interest has developed the research in *Solea senegalensis*, especially the research about genetic basis: identification and sequencing of genes, performing physical maps, cytogenetic maps, to apply to improvement programs.

This has required development of techniques such as next generation sequencing (NGS) that allows knowing the DNA sequence, PCR to amplify DNA sequences, Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) to physically locate on a chromosome with a labeling sequence, microdissection to isolate chromosomes and DOP-PCR, technique that allows amplify all the DNA microdissected without knowing the sequence, then the product is labeling for the realization of chromosome painting by FISH.

Therefore, the development of these techniques in *Solea senegalensis* is necessary for better results in researching. The work focused on improving some techniques, especially It focused on the spread of metaphase spreading, to continue with the optimization of the techniques of laser microdissection and DOP-PCR from microdissected material.

The optimization process was based in three steps. First, improving of technique for obtaining metaphase spreading. it developed by changing conditions and protocols spread that was performed under normal slides and second microdissection slides with a membrane of polyethylene terephthalate (PET). Then, the conditions for the laser microdissection microscope was improved. A methodology cutting was developed and the cutting parameters were adjusted such as power, speed, number of cutting cycles, the focus of the cuts and the catapult or launch of the cut section with a laser pulse to a PCR tube .Finally, the conditions of the DOP-PCR reaction were adjusted. We use two types of polymerases, a heat-sensitive and another thermolabile, each with its procedure. Also the number of chromosomes necessary for successful amplification was adjusted.

## 2 Introducción

### 2.1 Características de Solea Senegalensis

#### 2.1.1 Taxonomía

El lenguado senegalés se denomina científicamente como *Solea senegalensis* (Kaup 1858, pertenece al orden de los Pleuronectiformes (caracterizados por ser peces aplanados, asimétricos y carnívoros), está clasificado taxonómicamente según la base de datos estadounidense NCBI [1] como:

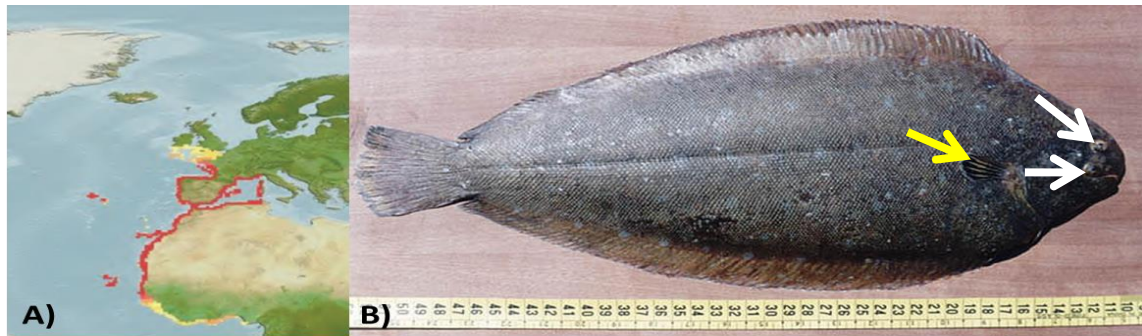
Superreino	•Eukaryota
Reino	•Metazoa
Filo	•Chordata
Subfilo	•Craniata
Superclase	•Actinopterygii
Subclase	•Neopterygii
Infraclase	•Teleostei
Orden	•Pleuronectiformes
Suborden	•Pleuronectoidei
Familia	•Soleidae
Genero	•Solea
Especie	• <i>Solea senegalensis</i>

#### 2.1.2 Características biológicas

El lenguado senegalés es un tipo de pez plano con aspecto ovalado y morfología asimétrica, en su estado adulto, puede alcanzar un tamaño de 60cm, siendo el más común de 45cm [2] y un peso a ese tamaño que ronda el 1kg [3], sin embargo su talla mínima comercial corresponde a 24cm y un peso de 120g/Ud [4].

Es un pez demersal, lo que significa que habita cerca del fondo marino, además su actividad predominante es nocturna, pasando la mayor parte del día enterrado en la arena del fondo. La profundidad en la que suele vivir oscila entre los 15 a 60 metros de profundidad [2], y se localiza principalmente en la costa atlántica y mediterránea del sureste de Europa y noroeste de África [5] (Fig. 1A).

Su alimentación principal se basa en pequeños peces, larvas de poliquetos y moluscos bivalvos que obtiene del fondo marino. Fenotípicamente es muy similar a otras especies como *Solea solea*, la única diferencia está en que *Solea senegalensis* tiene pigmentadas las regiones interradales de la aleta pectoral (Fig.1B) [4].

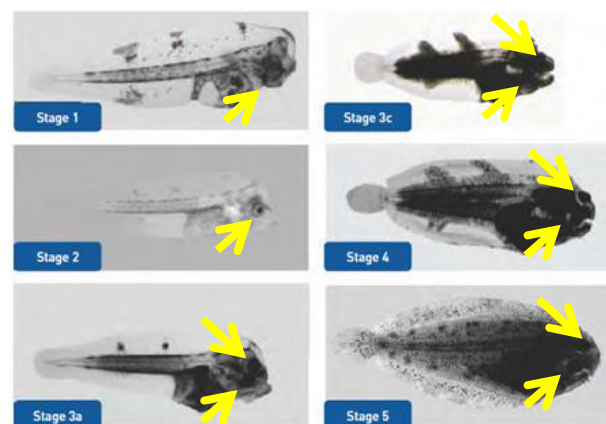


**Figura 1:** A) Distribución geográfica de mayor a menor presencia donde rojo>amarillo. [5] B) *Solea senegalensis* adulto, se señalan los ojos con flechas en blanco, y la posición de la marca característica de especie con flechas en amarillo.

### 2.1.3 Ciclo biológico

El biológico del lenguado senegalés se caracteriza por una entrada en la madurez sexual a los 3 años de edad en los machos, y entre el 3º y 4º año de vida en las hembras [6]. Los meses de reproducción principalmente son los de primavera que comprenden abril-mayo-junio, aunque hay también un periodo con menor importancia en otoño, en los meses de septiembre-octubre-noviembre [6]. La etología (comportamiento animal) del proceso es importante en el éxito de la fecundación [7]. La hembra hace la puesta de los huevos y posteriormente el macho los fecunda. Los huevos no son adhesivos ni requieren cuidados paternos, las larvas son pelágicas y cuando nacen tienen hábito diurno hasta la fase juvenil, donde adquieren la morfología y hábitos del adulto [6].

El lenguado senegalés cuando nace es simétrico y mide unos pocos milímetros. Durante su desarrollo se produce una metamorfosis, que le da las características morfológicas propias del adulto. Entre los cambios más relevantes en la metamorfosis se encuentra, la migración de los ojos del lado izquierdo al derecho (Fig.2) y el patrón de pigmentación del adulto, donde la zona de los ojos es pigmentada y la zona inferior sin pigmentar.

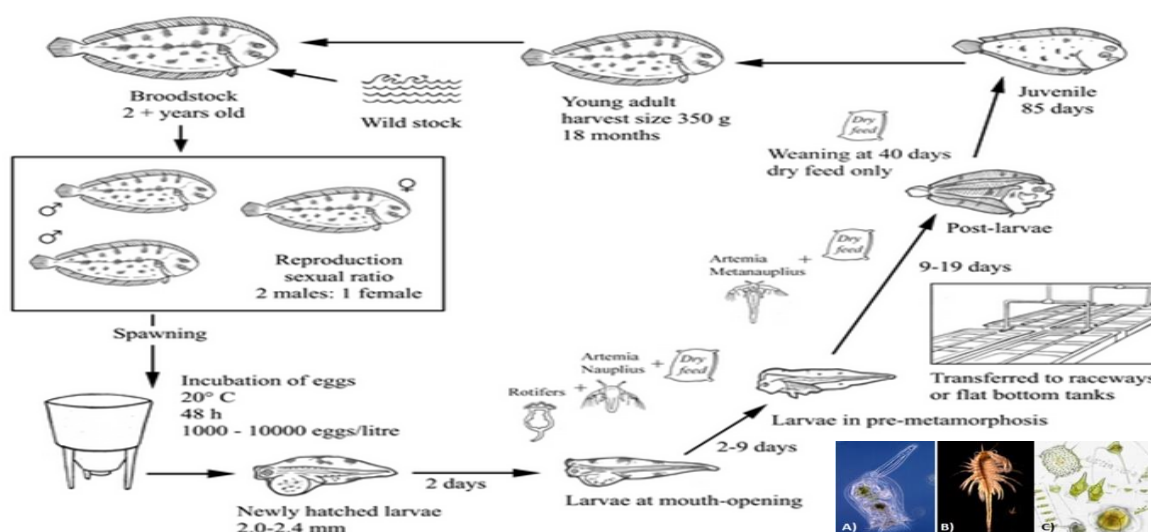


**Figura 2.** Metamorfosis del lenguado senegalés. Posición ojos flechas amarillas. [5].



### 2.1.4 Acuicultura del lenguado

La producción del lenguado en acuicultura (Fig. 3) se ha mejorado notablemente desde su inicio a finales del siglo pasado [5; 8; 9]. Su producción consiste primeramente en obtener adultos reproductivamente competentes para la obtención de los huevos. Para la reproducción en cautividad el ratio óptimo entre machos y hembras es importante, en *Solea sp* corresponde a 2 machos: 1 hembra [10]. Posterior se obtiene la fecundación de los huevos, los cuales se recogen e incuban a 20°C durante 48 horas. Se obtienen entonces larvas con la boca cerrada, que la abrirán en los dos días siguientes [10]. La obtención de alevines en el lenguado senegalés no plantea una dificultad significativa, obteniéndose la supervivencia de casi la totalidad de los alevines, hasta los 20-21 días que realizan la metamorfosis. La alimentación se realiza a base de fitoplancton, rotíferos y artemias salinas (Fig.3 A; B; C) dependiendo la edad de los alevines [8]. Mencionamos que aunque el destete de los lenguados en un principio supuso un problema, con la llegada de piensos hidrolizados de harina de pescado se pudo superar sin problemas obteniendo un 80% de supervivencia a los 90 días después de la eclosión [8].



**Figura 3:** Esquema de la producción en acuicultura de *Solea sp*. Imágenes abajo a la derecha. A) Rotífero B) Artemia C) Fitoplancton.[10]

El tiempo para la obtención de peces con la talla comercial sobrepasa ligeramente el año, un resultado inicial prometedor ya que no se tienen las condiciones óptimas de cultivo, ni se han desarrollado programas de mejora genética [8], que sin duda mejorarían estas condiciones. Los únicos intentos de mejora genética se llevaron a cabo en 2014 se hicieron estudios para inducir la triploidía (3n) y ginogénesis (obtener alevines hembra) [11]. Además tenemos que la ocurrencia de patologías, es el principal limitante de esta etapa de engorde. Esta situación se ve agravada si se sube la

temperatura por encima de los 22°C o se descuida la higiene del tanque [8]. Por otra parte se desconocen las condiciones de cultivo ambientales que puedan hacer combatir al lenguado senegalés frente a estas patologías y la actuación frente a estas es más bien empírica [8].

### 2.1.5 Interés en pesca y acuicultura

El mercado es una variable importante a tener en cuenta en la producción de cualquier producto, en 2009 el precio del lenguado senegalés alcanzó un precio medio final de 12-14 €/Kg, [5], en 2014 obtuvo un precio de 12.35€ [12], en la mayo de 2015 estuvo entorno a los 15,50€ [13]. En el futuro se prevé que su gran cotización y demanda en el mercado europeo, mantenga el precio y por tanto no se llegue a saturar el mercado [5].

El lenguado es una especie que ha sido objeto de estudio para su producción [9; 14] ya que cuenta con mucho interés y potencial como se ha podido observar su creciente demanda y producción de últimos años en países como España, Francia y Portugal. La producción del lenguado en acuicultura se ha quintuplicado desde 2007 a 2013 (Fig.4), incluso se tiene previsto instalar una planta en Islandia de 500Tn/anuales [5]. La producción en acuicultura del lenguado en Andalucía en 2014 fue de 243.5 toneladas con un valor de 2.110.000€ (el 99.5% en Cádiz) [13], la cual es muy superior a la pesca, que en Andalucía supusieron 12.25 toneladas con un valor de 151.000€ [12]. Además, en el lenguado hasta al menos 2005, no se habían implementado grandes programas de mejora genética [8], por lo cual es una especie candidata para desarrollarlos aumentarían la producción y rendimiento, por ello se ha intensificado el interés en investigación [7; 15; 16; 17], y sobre todo la investigación de las bases genéticas [6; 7; 11; 18; 19; 20].

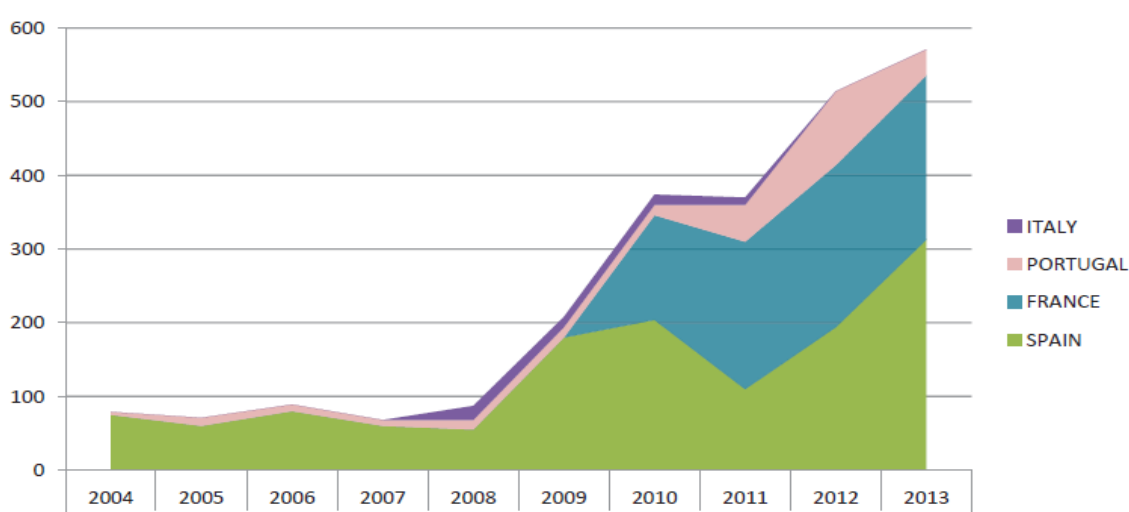


Figura 4: Producción del Lenguado senegalés en toneladas (eje y), entre 2003-2013 (eje X) y según países. [41]

## 2.2 Técnicas citogenéticas y moleculares

### 2.2.1 Citogenética

La citogenética es el área de la genética que estudia la herencia a través del análisis de los cromosomas, es decir de dilucidar la estructura, forma y comportamiento de los cromosomas. La citogenética es interesante uso clínico en diagnóstico asociado a síndromes [21], cáncer [22] u otras alteraciones clínicas [21].

La correcta extensión de los cromosomas es importante para obtener buenos resultados al aplicar técnicas citogenéticas. En una misma especie, dependiendo de tipo celular empleado para la preparación de las placas metafásicas, se pueden obtener mejores resultados. En animales es usual obtener extensiones a partir de sangre periférica, medula ósea, fibroblastos, líneas celulares linfoides, y células germinales [23], ya que tienen una alta tasa de división (para el arresto mitótico). Igualmente, muchos tipos celulares tienen la ventaja de ser libres como por ejemplo los linfocitos, es decir, las células no están unidas a las células adyacentes facilitando las preparaciones cromosómicas.

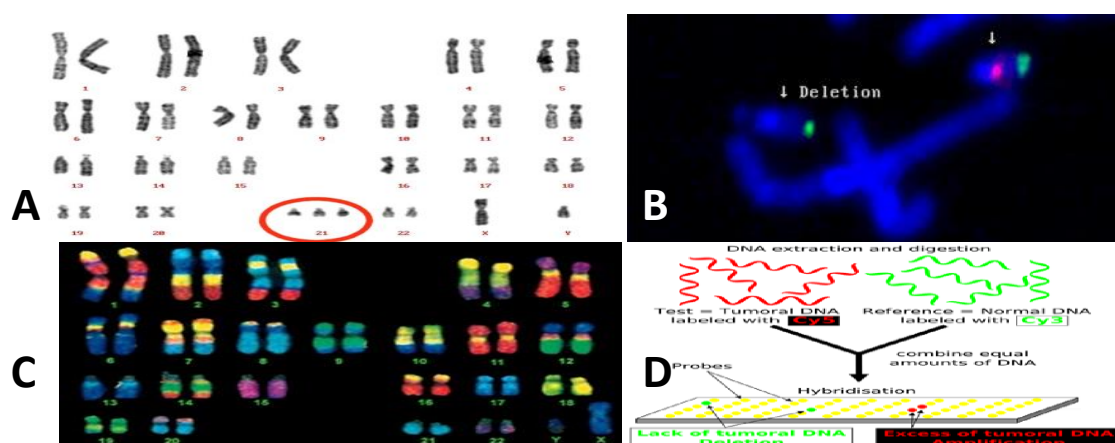
Los protocolos tienen en común, en primer lugar, el tratamiento con colchicina, que es un inhibidor de la formación del huso mitótico y que interrumpe la mitosis en metafase (arresto mitótico). En segundo lugar, el choque hipotónico para liberar los núcleos celulares. Aunque no es común para todos los tipos celulares, si la muestra de partida tiene las células agregadas estas necesitarán la disgregación celular. Posteriormente se realiza el *Splash* o “goteo” sobre el portaobjetos y se continúa con la fijación de la muestra. Finalmente se realiza la deshidratación, el envejecimiento y la tinción de la muestra para poder visualizarlas. Aun así hay multitud de protocolos para la obtención de preparaciones cromosómicas y cada uno cambia diferentes variables entre las que nos encontramos: la solución en la cual se disgregan las células (Carnoy, Ácido Acético entre otros), el pretratamiento de los portaobjetos antes del *Splash* (exposición de los portas al frío con o sin agua, condensar vapor de agua), la temperatura de fijación de las preparaciones después de hacer el *Splash*, la metodología de preparación, entre otras muchas variables. [24; 11; 25; 23; 21].

#### Técnicas citogenéticas

Después de obtener las preparaciones cromosómicas, para su visualización en el microscopio, previamente es necesario aplicar de alguna técnica que tiñan los cromosomas. Tradicionalmente este estudio se ha realizado con técnicas de tinción de amplias regiones de ADN del cromosoma en bandas según características genéricas de las secuencias, pero el poder de resolución de estas técnicas es bajo, de unas 500pb. La técnica más importante y principal es el bandeo Giemsa o G

desarrollada en 1971 por Seabright. Esta técnica tiñe con más intensidad la cromatina más condensada y menos intensa las zonas menos condensadas (Fig.5A). Sin embargo hay otro tipo de tinciones alternativas como son el bandeo Q, que utiliza mostaza de quinacrina, Bando R o “reverse” que tiñe de forma inversa a Giemsa, bandeo C que tiñe las regiones de heterocromatina constitutiva, Bando T que tiñe los telómeros, Bando Cd que tiñe el cinetocoro, tinción Ag-NOR que tiñe las regiones organizadoras del nucléolo. Con estas técnicas podemos caracterizar un cariotipo e identificar mutaciones cromosómicas estructurales y/o numéricas como son las deleciones, inserciones, translocaciones, poliploidías totales o parciales (Síndrome de Down trisomía del par 21, células tumorales entre otras afecciones) o aneuploidías, entre otras alteraciones siempre y cuando el poder de resolución lo permita.

Con el desarrollo de las técnicas moleculares la citogenética avanzó hacia nuevas técnicas englobadas en los que se conoce como citogenética molecular, que detectan grandes regiones de ADN mediante el marcaje de sondas con técnicas moleculares, aumentando la especificidad a nivel de secuencia y su poder de resolución. La principal técnica es la Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH), desarrollada en 1988 por Pinkel et al. Y Cremer et al. [28] mediante la cual se genera una sonda que consiste en una secuencia conocida de ADN que es marcada con fluorocromos (FITC o rodamina entre otros) o con haptómeros (biotina o digoxigenina). Estas sondas marcadas hibridan por homología con los cromosomas, que al ser excitadas se obtiene una señal cromática [21]. Con esto se consigue detectar microdeleciones como el síndrome de Di-George [21] (Fig.5B), microinserciones y otras alteraciones que la citogenética convencional no puede diagnosticar por la limitación de su poder de resolución.



**Figura 5:** Técnicas citogenéticas tradicionales (A) y moleculares (B, C, D). A) Bando G en humano con síndrome de Down, la trisomía en los cromosomas 21 está marcada. B) FISH en humano para diagnosticar la enfermedad de Di-George causada por una microdelección en la sección 22q11.2. C) Pintado cromosómico en cariotipo humano. D) CGH Array, esquema de la técnica aplicado en células tumorales.

Hay otras técnicas derivadas de la FISH, entre las que nos encontramos la genómica comparativa por hibridación (CGH) desarrollada en 1992 por Kallioniemi y colaboradores [28], mediante la cual se logra hibridar los cromosomas con pruebas marcadas con dos sondas de diferente color, el control y la muestra problema. Las regiones hibridadas se identifican y cuantifican y, al comparar la señal de la muestra problema con la control en un cariotipo normal, se puede identificar si hay un aumento de una de las señales del control frente a la muestra, lo que significaría que la muestra tendría una pérdida de ADN en esa zona, o si hubiera más señal indicaría una ganancia de ADN la muestra con respecto al control en esa sección. La técnica del Array CGH (Fig.5D) sigue el principio anterior pero las sondas se realizan en una placa con pequeños pocillos donde se mide la señal de este, siendo de utilidad para conocer si hay anomalías como en el diagnóstico del cáncer. FISH-M o multicolor y el pintado cromosómico (Fig.5C) desarrollada en 1990 por Nederlof y colaboradores [28], esta técnica consiste en el marcaje de la secuencia de cada cromosoma (o secuencias más pequeñas en el mBAND o bandeado multicolor) con diferentes colores y al hibridar se pueden identificar alteraciones cromosómicas si un cromosoma presenta más de un color. Además es de utilidad para el estudio de parentescos, evolución, filogenia entre otros [29].

## 2.2.2 Otras técnicas moleculares: Microdissección y DOP-PCR

### Microdissección

La microdissección puede revolucionar el análisis molecular, ya que nos permite aislar una región concreta de una célula, orgánulo, cromosoma para su posterior análisis. Esta técnica se puede aplicar en cualquier campo biómico (genómica, proteómica, metabolómica o transcriptómica). La ventaja de poder aislar una región concreta nos permite disminuir las contaminaciones (si se utiliza la tecnología láser) y obtener un examen más fiable de la región a analizar [30; 31; 32; 33].



**Figura 6:** Microdisector Laser PALM Robo Microbeam Z1 de Zeiss empleado para realización del TFG.

Según la tecnología utilizada tenemos, por un lado microdisectores de aguja, los cuales cortan y recogen la sección con una microaguja. Por otro lado los microdisectores de captura láser (LMC) (Fig.6), los cuales utilizan un haz láser (infrarrojo (IR) o Ultravioleta (UV)). Esta tecnología permite cortar una membrana termolábil, normalmente compuesta por polietilén naftalato (PEN) o por PET. Posteriormente se emite un pulso láser que permite la recolección mediante el catapultado o lanzamiento de la muestra microdisccionada hacia un gel adhesivo situado dentro del tapón del tubo de PCR.

## DOP-PCR

La DOP-PCR del inglés (Degenerate Oligonucleotide-Primed-Polymerase Chain Reaction) fue desarrollada en 1992 por Telenius y colaboradores. [28] consiste en una amplificación inespecífica, es decir que amplifica todo el ADN de la muestra gracias al uso de *primers* degenerados. Los *primers* degenerados tienen variaciones de nucleótidos en algunas posiciones. Por ejemplo la letra N representa variaciones de los 4 nucleótidos (Adenina (A), Timina (T), Citosina (C) y Guanina (G)), El primer degenerado para la DOP-PCR es (5'-CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G-3')[34], el cual estaría compuesto por 6 posiciones distintas degeneradas con 4 posibles nucleótidos, lo que resulta en una mezcla  $4^6 = 4096$  *primers* diferentes. Por tanto, la base molecular de esta técnica es la inespecificidad de los *primers* degenerados con los cuales se consigue amplificar el ADN de la muestra al completo con la ventaja de que no necesitar conocer la secuencia. Por otra parte durante el desarrollo de la DOP-PCR, los *primers* se unen aleatoriamente, con lo que se obtienen fragmentos de diferentes tamaños, dependiendo la distancia entre dos *primers* aleatorios, uno que actúa como *forward* y otro como *reverse*. La longitud media obtenida es de 0.2-0.8kb [34].

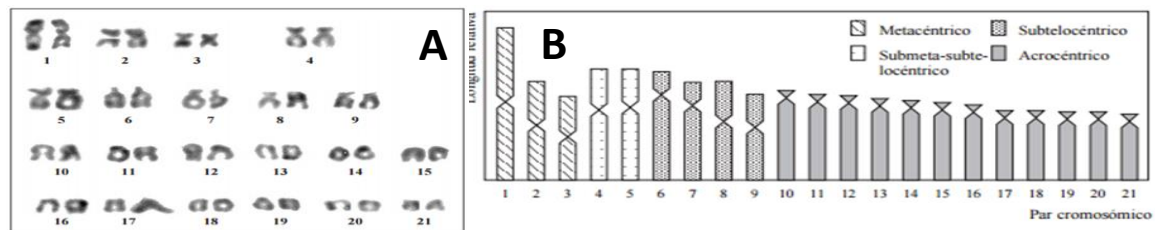
Al separar la muestra electroforéticamente nos genera un *smear* o manchado debido a heterogeneidad de los tamaños de los fragmentos producidos. Sin embargo un inconveniente de la inespecificidad de la técnica es que amplificaría tanto la muestra problema como cualquier tipo de contaminación. Esta técnica se ha aplicado, entre otros usos, para la amplificación de cromosomas a partir de muestras microdisecionadas [34; 35], para después realizar un pintado cromosómico e incluso para aplicar posteriormente la técnica CGH en diagnóstico preimplantacional [36]

### 2.2.3 Antecedentes

El cariotipo de *Solea senegalensis* fue dilucidado por Vega y colaboradores en 2002 [37], de manera que resulta en un organismo diploide (2n) cuyo cariotipo consta de 21 parejas cromosómicas, es decir 42 cromosomas con 48 brazos cromosómicos (Fig.7). Las parejas se catalogan en 3 parejas metacéntricas, 2 parejas submeta-subtelocéntricas, 4 parejas subtelocéntricas y, por último, 12 pares cromosómicos acrocéntricos [37].

El cariotipo del lenguado senegalés es muy similar al del rodaballo, (*Scophthalmus maximus*), una especie filogenéticamente cercana y que se diferencian en el número de cromosomas, aunque se mantiene el número de brazos (el lenguado tiene 2 acrocéntricos menos y 1 metacéntrico más). Se ha propuesto la hipótesis de que esta diferencia puede deberse a una translocación robertsoniana de dos cromosomas acrocéntricos para dar lugar al metacéntrico [37]. Esto podría ser probado mediante el pintado cromosómico, probando sondas de pintado cromosómico generadas de una de

las especies, en la otra. Así se puede conocer si se ha producido evolutivamente esta reorganización cromosómica. La generación de sondas de pintado cromosómico en el lenguado senegalés está directamente relacionado con las perspectivas futuras de este trabajo.



**Figura 7:** A) Cariotipo de *Solea senegalensis*. B) Ideograma del cariotipo de *Solea senegalensis* donde se puede ver la longitud relativa de los cromosomas y su clasificación. [37]

La citogenética en el lenguado senegalés ha sido utilizada para programas de mejora genética. En 2014 se empleó para contrastar la inducción de triploidía ( $3n$ ) y ginogénesis (obtención de alevines hembras) del lenguado senegalés [11]. La triploidía es útil ya que se obtienen organismos de mayor tamaño, incluso presentan un crecimiento más rápido, carne de mayor calidad y mayor viabilidad debido a que no presentan la maduración gonadal al ser individuos estériles []. La ginogénesis es útil para determinar las bases genéticas de la determinación del sexo, realizar mapas genéticos, producir todos los individuos machos o hembras ya que hay especies que un determinado sexo tiene mayor calidad y valor comercial.

Por otra parte se han realizado estudios de localización de las Regiones NOR con FISH monocromática y bicromática [18]. Además también se han localizado clones BAC (Cromosoma Artificial Bacteriano) para el desarrollo del mapa físico de genes de interés para la acuicultura [6]. Otros estudios realizados en el lenguado senegalés se basaron en el uso de técnicas de NGS para la caracterización de transcriptomas, para posteriormente anotarlos e integrarlos en una base de datos (SoleaDB) [38]. También se han realizado avances en el mapeado genético molecular, usando NGS complementado con técnicas BAC-FISH [20].

Todos estos estudios, están orientados hacia un mayor conocimiento de la especie, el cual pueda reportar un futuro beneficio en su producción. Para ello, se ha visto que la aplicación de técnicas citogenéticas es esencial para recabar datos que permitan avanzar en este conocimiento.



### 3 Objetivos

La correcta optimización de las muestras citogenéticas y técnicas moleculares utilizadas es un paso limitante para obtención de buenos resultados en las técnicas citogenéticas aplicadas *a posteriori*.

Hasta antes del presente trabajo, existían diversos problemas relacionados con la obtención de preparaciones cromosómicas en portas PET, la microdissección de cromosomas tan pequeños como los de los peces planos y la amplificación de los mismos. La puesta a punto de estos problemas permitirían lograr un gran avance en el estudio citogenético de la especie.

Por tanto se establece como **objetivo principal**.

- ❖ Optimización de la condiciones para la microdissección láser y amplificación de los cromosomas aislados.

Para la consecución de este objetivo se desarrollaron los siguientes **objetivos parciales**:

- a) Obtener las mejores extensiones cromosómicas posibles en portaobjetos PET, para facilitar el aislamiento posterior de los cromosomas.
- b) Lograr las mejores condiciones de corte y catapultado, para obtener el corte más fino, menos energético y efectivo ajustando las condiciones del láser y la metodología del proceso.
- c) Conseguir la cantidad mínima de cromosomas y condiciones óptimas para el desarrollo de la DOP-PCR.



## 4 Solución Técnica/Resultados

### 4.1 Material y Métodos

#### 4.1.1 Preparaciones cromosómicas

Existen innumerables variables que influirán en las preparaciones cromosómicas. La calidad y el grado de separación de las extensiones cromosómicas dependerá de la especie de estudio, verbigracia, no es lo mismo separar los cromosomas de una especie con 6 cromosomas como los mosquitos, que el helecho *Ophioglossum recitulatum* el cuál ostenta el record de la especie conocida con más cromosomas, con 1260 [39]. También dependerá del tipo celular del cual se preparan y del protocolo utilizado, (estas dos últimas comentadas en la introducción).

La primera variable que se presenta en el lenguado senegalés es el tipo celular del cual se obtienen las preparaciones metafásicas. En el trabajo se decantó por usar larvas de lenguado, ya que se tenían suficientes existencias disponibles, son fáciles de almacenar y obtener igualmente se han utilizado en otros trabajos en el lenguado senegalés [6; 11; 37]. Las larvas utilizadas fueron tratadas previamente con colchicina, posteriormente fueron sometidas a un choque osmótico y por último fueron conservadas en Carnoy (metanol y ácido acético 3:1) a 4°C.

Por tanto, en el trabajo se optó por variar distintas condiciones en los protocolos para la obtención de preparaciones cromosómicas a partir del *stock* de las larvas disponibles, esto se realizó primero en portaobjetos de vidrio convencionales de un tamaño de 75 mm x 26 mm x 1 mm, al ser más económicos. En segundo lugar, se realizó en portaobjetos PET de un tamaño de 75mm x 26mm x 0.17mm, reduciendo el número de ensayos en los PET y por tanto la cantidad de portaobjetos utilizados.

#### Optimización en portaobjetos de vidrio convencionales

Se manejaron 3 protocolos para la obtención de las muestras en portaobjetos normales, que, de ahora en adelante, denominaremos Calor, Zeiss y Jena. A todos los protocolos se les aplicaron un pretratamiento y post-tratamiento común.

##### ❖ Pretratamiento.

El pretratamiento se realizó sobre los portaobjetos con el objetivo de limpiarlos, y en las larvas con la finalidad de reducir la suciedad de que generan en los portaobjetos.

- El pretratamiento de los portaobjetos normales se realizó mediante un lavado de los portaobjetos con una disolución de agua, etanol y jabón para eliminar las impurezas. Los portaobjetos lavados y secados se almacenaron en una caja para portaobjetos
- El pretratamiento de las larvas para la obtención de las placas metafásicas consistió en la eliminación del saco vitelino. La eliminación del Saco Vitelino (SV) (Fig. 8). se realizó con lancetas y lupa, esta operación era necesaria para obtener menos suciedad en las preparaciones cromosómicas. Si no se elimina el saco vitelino, todas las proteínas que lo componen, quedarían fijadas en el portaobjetos aumentando la suciedad.



**Figura 8:** Extracción del saco vitelino (SV) con el uso de una lupa y lanceta. A) Larva de *Solea senegalensis* intacta. B) Lanceta y extracción del saco vitelino. C) Larva sin saco vitelino, el saco vitelino está dentro del círculo rojo.

#### ❖ Tratamiento.

Se utilizaron 3 protocolos distintos, los cuales presentaban distintas variaciones entre sí, lo que generó diferencias entre las preparaciones cromosómicas según el protocolo utilizado. Las variaciones consistieron en:

El disolvente utilizado para la homogenización de las larvas, ácido acético o Carnoy. La temperatura de la placa calefactora, que varió entre los 37-50 °C. Las condiciones de conservación de los portaobjetos hasta antes del *splash*, que algunos fueron calentados y otros enfriados estando sumergidos en agua y también sin sumergir. Asimismo, variaron en la metodología después del *splash*, donde en el protocolo de calor se retiró muestra cada pocos segundos para generar halos y los otros dos se adicionaron unas gotas de disolvente para facilitar la extensión de los cromosomas.

#### Protocolo Calor por halos.

El protocolo de calor por halos se denomina así porque es el único de los tres que se aplica calor al portaobjetos antes de realizar el *splash*, y por la disposición de las muestras al generarse los halos.

## Procedimiento:

1. Pretratamiento.
2. Se homogenizaron 3-4 larvas en 50µL de ácido acético al 45%. La homogenización consiste en disgregar las células de 3-4 larvas y liberar los cromosomas, lo cual se consigue mediante un pipeteo continuo con una micropipeta p200 y unos 8 minutos por muestra (hasta asegurarse que esté completamente homogenizado).
3. Se calentaron los portaobjetos en una placa calefactora a 45°C antes de realizar el *Splash*. Con esto conseguimos facilitar la dispersión de la gota.
4. Se realizó el *splash* que consiste en un goteo en el portaobjetos del homogenizado desde la máxima altura posible 50-60 cm. Posteriormente se puso el portaobjetos con la muestra en una placa calefactora a 45°C.
5. Se retiró ácido acético cada 15-20 segundos para la formación de los halos.
6. Post-tratamiento.

Protocolo según Zeiss.

El nombre de este protocolo se debe a que es un protocolo proporcionado por Zeiss, en este protocolo los portaobjetos se enfrían antes de realizar el *splash*.

## Procedimiento:

1. Pretratamiento.
2. Se metieron los portaobjetos en frío a -20°C sin agua. Se toman justo antes de realizar el *Splash*, el frío de los portaobjetos hace que la humedad ambiental condense en forma de película y facilite la extensión de los cromosomas.
3. Se homogenizaron 3-4 larvas en 50µL de Carnoy.
4. Se realizó el *Splash* y se puso el portaobjetos en la placa calefactora previamente calentada a 37°C y cubierta con un paño húmedo. El paño húmedo produce una evaporación de la muestra más lenta.
5. Se añadieron 3-4 gotas de Carnoy desde unos 20cm. Esto se realiza para facilitar la extensión de los cromosomas, que es producida por la caída de las gotas de Carnoy.
6. Se esperó a que se secarán las preparaciones durante una hora (produciendo el envejecimiento de los cromosomas).
7. Post-tratamiento.

### Protocolo según Jena.

Este protocolo se denominó así porque procedía de Jena (Alemania). Al igual que el protocolo anterior, los portaobjetos se enfrían antes del *splash*, aunque en este protocolo se mantienen sumergidos en agua en el proceso de enfriamiento.

#### Procedimiento:

1. Pretratamiento.
2. Se metieron los portaobjetos en frío a -20°C en agua destilada. Se toman justo antes de realizar el *Splash*, el frío de los portaobjetos hace que la humedad ambiental condense además de estar sumergidos en agua con lo que se facilitó la extensión de los cromosomas.
3. Se homogenizaron 3-4 larvas en 50µL de Carnoy.
4. Se realizó el *Splash* y se puso el portaobjetos en la placa calefactora previamente calentada a 50°C y cubierta con un paño húmedo.
5. Se añadieron 2-4 gotas de Carnoy desde unos 20 cm.
6. Post-tratamiento.

#### ❖ **Post-tratamiento.**

El post-tratamiento se basó en tres partes. En primer lugar se realizó la deshidratación de las muestras, que permite eliminar el agua y humedad para facilitar la tinción. Se continuó con el envejecimiento que permite desnaturalizar las proteínas, fijar las muestras al cristal y eliminar los últimos restos de humedad para conseguir una correcta tinción de los cromosomas. Por último se desarrolla la tinción con Giemsa, teñirá las muestras para su visualización al microscopio.

### Deshidratación.

Una vez terminado el tratamiento, las muestras se introdujeron en disoluciones sucesivas de etanol frío a -20°C, de menor porcentaje a mayor porcentaje para eliminar el agua y que facilitase la posterior etapa de tinción.

- 1 minuto en etanol 30%
- 1 minuto en etanol 50%
- 5 minutos en etanol 70%
- 5 minutos en etanol 90%
- 5 minutos en etanol 100%
- 10 minutos en etanol 100% (RT o Temperatura ambiente).

### Envejecimiento.

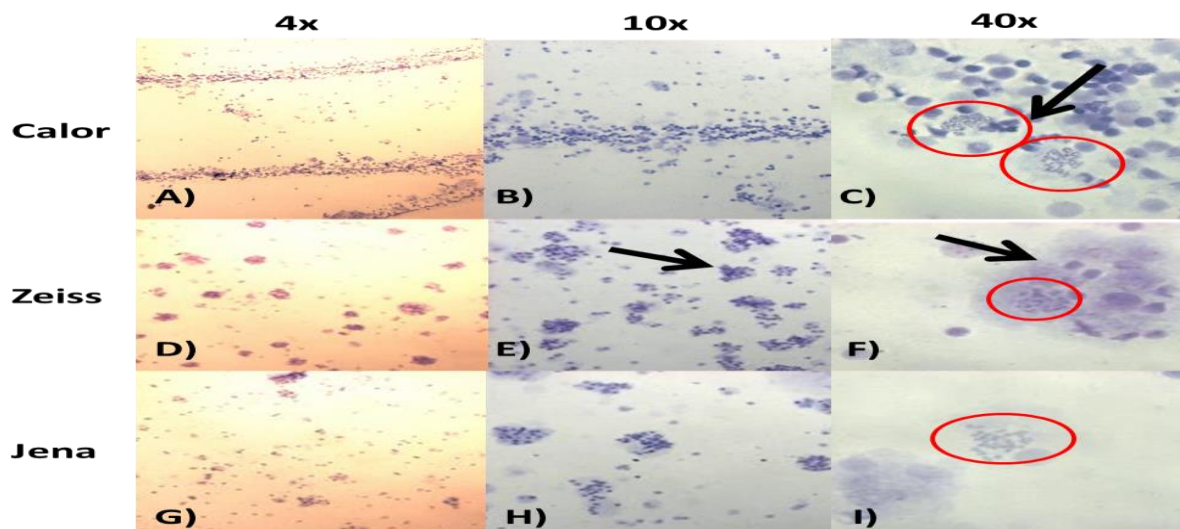
Con el envejecimiento o *aging* se consigue la desnaturalización de las proteínas, eliminar el agua, fijar y permitir la adherencia de la muestra al cristal [23]. El proceso consistió en introducir los portaobjetos durante 1 hora en una estufa a 72°C.

### Tinción con Giemsa.

La tinción con Giemsa, como hemos detallado en la introducción, permite ver las estructuras cromosómicas según la condensación de la cromatina (Fig.5A).

- Realizar una disolución de Giemsa al 8% en tampón fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.025M, ajustar a pH 6.8 con NaOH). El volumen necesario es de 5mL por muestras. Se añadió en un eurotubo 1,6mL de Giemsa puro y 18.4mL de tampón fosfato. La disolución de Giemsa 8% necesita ser preparada el mismo día de uso, ya que de no ser así se pueden generar precipitados y degradación del colorante, obteniéndose tinciones de mala calidad.
- Teñir las preparaciones con Giemsa 8% durante 15 minutos.
- Lavar con agua destilada hasta que deje de desprender colorante.

Hay que resaltar que se realizaron varias veces los protocolos en diferentes días, para intentar aumentar la reproducibilidad de los resultados. Se visualizaron las preparaciones al microscopio (Fig.9). Para determinar la morfología de las preparaciones, se usaron los aumentos de 4x, 10x y 40x. Para medir del tamaño de las placas metafásicas se usó el aumento de 40x.



**Figura 9:** Placas metafásicas (círculos rojos) en portaobjetos normales de vidrio. El protocolo utilizado (Calor, Zeiss o Jena) se detalla en la fila. El aumento se detalla arriba de las columnas. C) La flecha señala la proximidad de otros núcleos. E y F) Las flechas señalan los cúmulos de núcleos.

### Análisis de datos en portaobjetos convencionales

Para analizar el tamaño de las placas, se midieron el tamaño de área en píxeles mediante el software de edición gráfica **ImageJ**. Para realizar este análisis es importante usar el mismo microscopio, aumento y cámara para poder comparar los datos.

Microscopio utilizado: **Axioskop 2 plus Zeiss**. Cámara de fotos: **CCD CoolSnap photometrics inc**. Aumento: **40x**.

Se realizaron las siguientes medidas en portaobjetos convencionales, donde n es el número de placas metafásicas medidas

- Método Calor (n=36) a partir de 9 portaobjetos distintos los cuales no fueron todos preparados el mismo día, y de cada portaobjeto se midieron 4 placas metafásicas aleatoriamente.
- Método Zeiss (n=40) a partir de 10 portaobjetos distintos los cuales no fueron todos preparados el mismo día, y de cada portaobjeto se midieron 4 placas metafásicas aleatoriamente.
- Método Jena (n=36) a partir de 9 portaobjetos distintos los cuales no fueron todos preparados el mismo día, y de cada portaobjeto se midieron 4 placas metafásicas aleatoriamente.

Se debe resaltar que aunque se partió del mismo bote de larvas, cada portaobjetos necesitaba entre 3 y 4 larvas, lo que inducía un grado de aleatoriedad en la cantidad y calidad de las placas metafásicas, ya que todas no tienen el mismo ratio de división. Para eliminar esta componente estocástica, se tomaron medidas de distintas placas, elaboradas en distintos días.

Después los datos fueron tratados estadísticamente para comprobar objetivamente si el incremento de la media del área de las placas metafásicas era significativo o no mediante Excel. Para ello se utilizó la función =Prueba.Z(Matriz;x;[Sigma]) que sirve para conocer el p-valor de una de las colas, por tanto el resultado se multiplicó por 2. Donde sí queremos comparar los datos A con B tenemos que insertaríamos en la Matriz la serie de datos "A", en "x" la media de los datos de "B", y en [Sigma] es la desviación típica de "B".

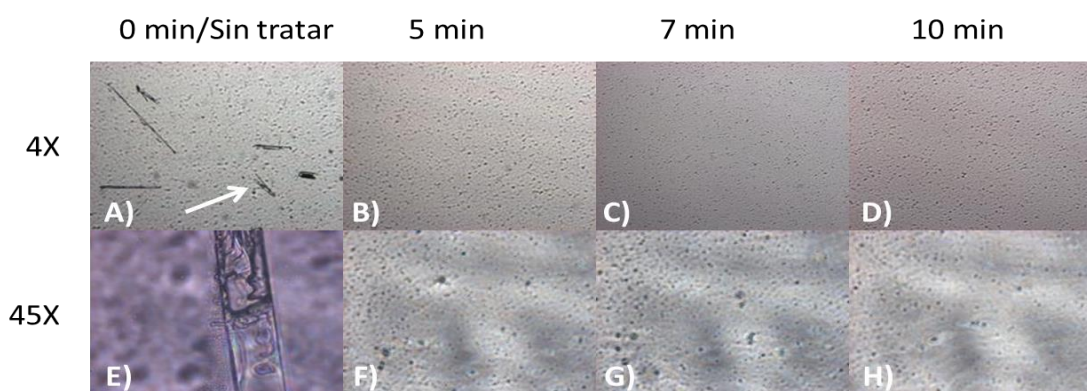
## Optimización en portaobjetos PET

Una vez obtenido el método óptimo en portaobjetos normales, pasamos al siguiente nivel que sería trasladar los resultados hasta ahora obtenidos a portaobjetos PET de 0.17mm.

Los portaobjetos PET presentaron dificultades añadidas al proceso porque: Primeramente, son muy frágiles, por tanto se tuvo que extremar la precaución para no dañarlos, después la extensión en los portaobjetos PET no era tan efectiva como en los portaobjetos normales, por último aunque se supone que debían de estar limpios y no requerir pretratamiento, en la realidad no fue así ya que tenían numerosas impurezas en forma de cristales (Fig.10). El pretratamiento realizado en portaobjetos convencionales no era válido por la debilidad de la membrana PET. Para intentar mejorar la técnica se obtuvo información de distintos protocolos [24; 25; 26], en el cual uno de ellos trataba sobre la mejora de preparaciones citogenéticas [23]. A partir de él se diseñó un experimento basado en aumentar la temperatura de la placa metafásica, ya que este protocolo sostiene que a mayor temperatura se obtiene mayor extensión y que la temperatura óptima esta entre los 60-65°C [23], lo cual representaba 10-15°C de diferencia con respecto a la temperatura usada anteriormente. Además presentaba la ventaja de no requerir otro instrumental o proceso distinto no evaluado anteriormente.

### ❖ Pretratamiento

Debido a las impurezas presentes en los portaobjetos PET, se diseñó un pretratamiento. Para su diseño se optó por probar un tratamiento sencillo, el cual consistió en mantener los portaobjetos PET en agua destilada en agitación a distintos tiempos (5 min, 7 min y 10 min) y se observó la eficacia del proceso (Fig.10).

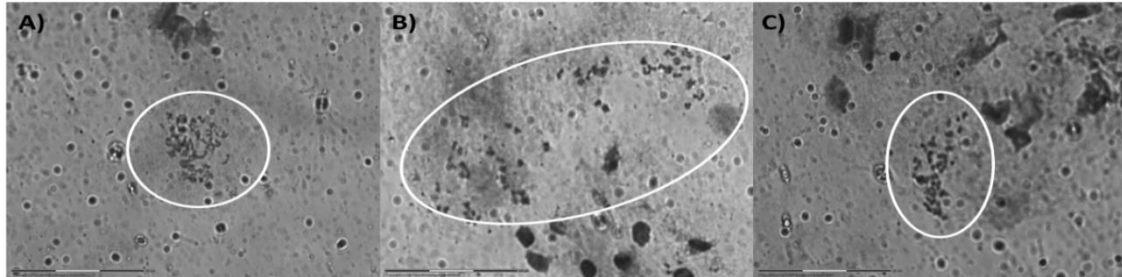


**Figura 10:** Tratamiento de los portas PET con agua destilada, el aumento del microscopio se indica en la fila izquierda y el tiempo de tratamiento en la columna superior. A) Portaobjetos PET sin tratar, se detalla los cristales de impurezas. E) Cristal de impurezas a mayor aumento.



### ❖ Tratamiento

El tratamiento se utilizó el indicado para el protocolo de Jena, pero se varió la temperatura de la placa calefactora a 50°C, 60°C y 65°C. (Fig.11).



**Figura 11:** Placas metafásicas (redondeadas en la imagen) en portas PET con un aumento de 100x a diferentes temperaturas preparadas según el protocolo de Jena. Temperatura placa calefactora A) 50°C. B) 60°C. C) 65°C.

### ❖ Post-tratamiento:

Se realizó como en portaobjetos convencionales, pero como al principio del proceso se observó que algunas muestras permanecían húmedas después de la tinción, lo que interfería en su visualización y corte, se añadió un proceso de secado en la placa calefactora.

### Análisis de datos en portaobjetos PET

Se realizó un análisis semejante al anterior aparatado, Con una variación en el microscopio: **Microdisector PALM Robo Z1, Zeiss**. Cámara: **AxioCam MRm, Zeiss**. Aumento: **100x**.

Se realizaron las siguientes medidas en portaobjetos PET, donde n es el número de placas metafásicas medidas:

- Temperatura 50°C (n=45) de las que se obtuvo el tamaño de 5 placas metafásica por cada uno de los 9 portaobjetos PET de los que se obtuvieron medidas.
- Temperatura 60°C (n=45) de las que se obtuvo el tamaño de 5 placas metafásica por cada uno de los 9 portaobjetos PET de los que se obtuvieron medidas.
- Temperatura 65°C (n=40) de las que se obtuvo el tamaño de 5 placas metafásica por cada uno de los 8 portaobjetos PET de los que se obtuvieron medidas.

Las medidas se realizaron también en distintas partes de los portaobjetos PET y las preparaciones fueron realizadas en diferentes días, para evitar la estocásticidad del proceso como en la etapa anterior comentamos.



### 4.1.2 Microdissección láser

La microdissección láser es una técnica muy polivalente, cuya resolución permite aislar secciones con un tamaño de unas pocas micras. Hay dos etapas limitantes para la obtención de aislados de calidad, un aislado de calidad consiste en poder aislar la sección que te interesa sin dañar la muestra. La primera etapa se desarrolló en el apartado anterior y consiste en tener disponibles preparaciones cromosómicas de calidad. La segunda etapa consiste en optimizar el aislamiento con el microdisector láser.

Para optimizar el proceso de aislamiento con el microdisector láser tenemos que tener en cuenta qué factores influyen en la obtención de un aislado de calidad. Podemos identificar dos factores, los cuales son: Primeramente los ajustes de los parámetros del láser donde se encuentra la energía de corte y del catapultado, la velocidad y el enfoque. En segundo lugar está el diseño de una metodología de corte, es decir, los pasos que se desarrollan para ejecutar la microdissección. Por tanto se ajustaron ambos factores para obtener un láser de poca energía, con un corte fino y limpio que no dañe los cromosomas.

Se dispuso de un microdisector modelo **PALM Robo Microbeam Z1, Zeiss** con una tecnología de corte basada en rayos UV-A. Los pasos fundamentales con los que se empezaron a diseccionar consistieron en:

1. Buscar una zona cercana a la sección que se desea cortar.
2. Enfocar perfectamente la muestra en el microscopio.
3. Realizar pruebas de corte con una energía de láser cercana a 37 y enfocar el láser.
4. Delimitar la placa metafásica y enfocar el microscopio.
5. Insertar el tubo de PCR con el gel adhesivo antes del catapultado en el microscopio para dificultar la contaminación ambiental. (Importante: usar guantes y desinfectar con etanol antes de manipularlo).
6. Iniciar el corte realizando con 1 ciclo y la energía ajustada en el paso 3), tomar las correcciones de enfoque necesarias.
7. Realizar catapultado con una energía de 10, en una zona lejos del aislado que no contenga muestra para evitar dañarla.
8. Extraer y cerrar el tubo de PCR con la muestra catapultada.
9. Añadir 10  $\mu$ L de Agua estéril al tapón y dejar resuspender al menos 1 día. El tubo debe de estar en frío y bocabajo para que se pueda resuspender la muestra.

### 4.1.3 DOP-PCR

La DOP- PCR, es una técnica molecular que nos permite amplificar toda la muestra de forma inespecífica. El mecanismo lo expusimos en la introducción y se detalla de forma gráfica en (Fig.12).

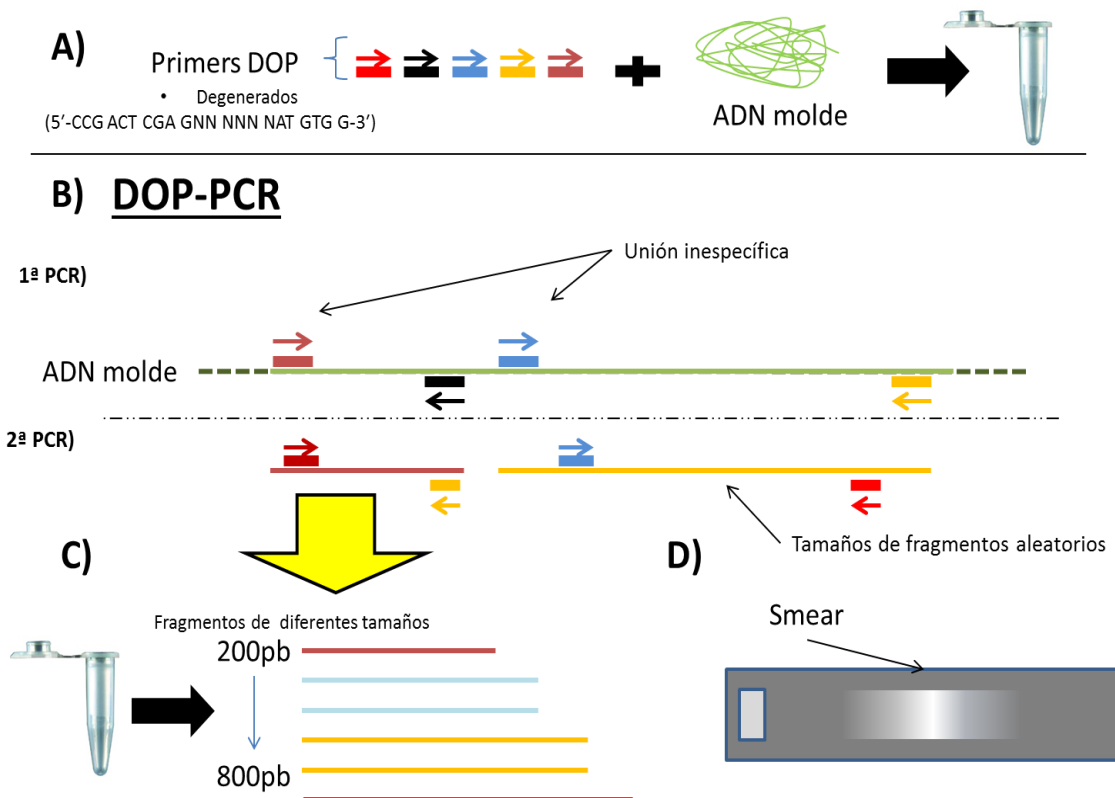
Aparte de la inespecífica, en el proceso es importante que se realicen dos PCRs consecutivas. Una primera que amplifica el ADN muestra y la segunda que además de amplificar el ADN muestra amplifica los fragmentos generados en la primera amplificación. Esto es de utilidad cuando se tratan con muestras con poca cantidad de ADN.

La dificultad de aislar cromosomas de las placas metafásicas del lenguado senegalés hace interesante optimizar el umbral mínimo de cromosomas microdisecionados y cantidad de microlitros que se requieren para obtener amplificación de la muestra. El ADN del cual se partió fue de muestras microdisecionadas que contenían diferentes cantidades de cromosomas y que fueron resuspendidas 24 horas en 10µL de agua estéril. Por otra parte se partió de dos protocolos distintos. El primero utilizaba una polimerasa termosensible, a la que hay que añadir polimerasa en cada ciclo de desnaturalización, siendo más laborioso además de aumentar la posibilidad de contaminación. El segundo que se utilizó una polimerasa termoestable, que se utiliza como una PCR convencional.

Se realizó un inventario de los materiales necesarios para el proceso, ya que era necesario usar campana de flujo horizontal y pretratar el material 30 minutos con rayos UV.

- Micropipetas P1000, P200, P20 y P2 utilizadas exclusivamente para la PCR.
- Cajas de puntas con filtro para las micropipetas
- Tubos de PCR.
- Gradilla de tubos de PCR
- Tubos eppendorf.
- Gradilla tubos eppendorf.
- Termociclador. (No-UV)
- Vortex.
- Microcentrífuga. (No-UV)
- Etanol para desinfectar.
- Caja de guantes.
- Marcador.
- Agua para DOP-PCR (fue autoclavada, tratada con 30 minutos de UV, y olicuetada en tubos eppendorf de 1mL conservados a -20°C).

Se trataron con rayos UV durante 30 minutos en la campana de flujo horizontal. La campana y el material que no se trató con UV (No-UV), se desinfectó todo antes con etanol. Los reactivos, a excepción del agua para la DOP-PCR, fueron almacenados en hielo en una caja isotérmica que no fue tratada con UV. Se prepararon las siguientes mezclas de reacción dependiendo de la polimerasa utilizada, además se varió el programa del termociclador.



**Figura 12:** Representación DOP-PCR. A) Representación de los Primers DOP y ADN molde. Se añaden también a la mezcla de reacción el resto de componentes para la PCR (polimerasa, Buffer, MgCl<sub>2</sub>...). B) Amplificación mediante dos PCR y unión de los *primers* a las secuencias homologas. 1. C) Producto final de la PCR con amplificaciones de diferentes tamaños y secuencias. D) Electroforesis en agarosa 1,5% del producto de DOP-PCR. Se ve un *Smear* o Manchado debido heterogeneidad de tamaño de los fragmentos (entre 0,2-0,8 kb).

## Amplificación en la DOP-PCR

### Polimerasa termolábil (Secuencasa)

La amplificación por DOP-PCR se realiza mediante dos amplificaciones.

La primera se realizó a baja temperatura, se consigue que los *primers* se anillen al ADN a 24°C, aumentando la inespecificidad de unión de los *primers* al ADN, y una posterior amplificación a 34°C en la que se usa una polimerasa termolábil, ya que una polimerasa termoestable a una temperatura tan baja tiene muy poca eficiencia en la amplificación (ejemplo: Taq. Polimerasa ronda el 20% [40]).

Posteriormente se realiza una segunda amplificación, la cual se realiza a “alta temperatura” y amplifica el material amplificado en la primera amplificación a baja temperatura. (Fig.12)

Por tanto tenemos dos mezclas de reacción que contienen.

- 1) Preparación de la mezcla de reacción para el ciclo de baja temperatura.

Si se tienen pocas muestras, se realiza en cada tubo eppendorf.

Si se tienen muchas muestras, se realiza una mezcla de reacción (tener en cuenta perdidas por pipeteo, así que añadir el volumen de 2 muestras adicionales).

**Tabla 1:** Mezcla de reacción para el ciclo de baja temperatura para la Secuenasa.

Reactivos	Concentración final	Por muestra
DOP Primer, 40µM	5 µM	0.63µL
SB- Buffer Secuenasa, 5x	0.6x	0.6µL
dNTPs, 2.5mM	200 µM	0.4µL

- 2) Dilución Secuenasa.

La Secuenasa es una polimerasa termosensible que se usa para el ciclo de baja temperatura de la DOP-PCR.

**Tabla 2:** Mezcla de buffer y Secuenasa que se añaden a cada ciclo.

Reactivos	Numero de muestras			
	1-2	3-6	7-9	10-13
SDB- Buffer Dilución Secuenasa	10.5 µL	21 µL	31.5 µL	42 µL
Secuenasa	1.5 µL	3 µL	4.5 µL	6 µL

- 3) Mezcla de reacción para la amplificación a alta temperatura.

Se deben de mantener en frío hasta el momento de hacer el mastermix o mezcla de reacción, además la polimerasa se añade justo antes de realizar la mezcla definitiva con el ADN. *Se tienen ya en cuenta el error de pipeteo en los volúmenes calculados.*

**Tabla 3:** Mezcla de reacción de Secuenasa. Ciclo a alta temperatura. Polimerasa Platinum Xfi Exo (-) de invitrogen

Reactivos. Concentración Stock.	Para 1 muestra
Agua DOP-PCR	32.03 µL
5xPu( Platinum polymerase 5x buffer)	10.0 µL
dNTPs, 2.5mM	4.4 µL
DOP Primer, 40 µM	1.37 µL
Mg50-MgCl <sub>2</sub> 50mM	2.5 µL
Plat- Platinum Tfi Exo(-) Polymerase	0.2µL

- 4) Añadir a un tubo de PCR entre 0-4  $\mu\text{L}$  de ADN microdisecionado, completar con agua DOP-PCR hasta que sume el ADN más el agua 4  $\mu\text{L}$ . Añadir los 1.63  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción a baja temperatura preparada en el primer paso 1).

Recordar **añadir 0.24  $\mu\text{L}$  de la dilución Secuenasa** (que contiene la polimerasa) después de cada ciclo de desnaturalización. Además hay que añadirla después de cada ciclo de desnaturalización, ¡Por que se DEGRADA!

Una vez terminada la amplificación a baja temperatura, se añaden 45  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción a alta temperatura a cada tubo de PCR y se inicia el segundo programa de PCR.

**Tabla 4:** Programa DOP-PCR para el termociclador con la Secuenasa

Programa ciclos a baja temperatura.			
Paso	Temperatura	Tiempo (min)	Observaciones
1	92°C	5:00	
2	25°C	2:00	Adicionar 0.24 $\mu\text{L}$ de Secuenasa a cada muestra
3	34°C	2:00	
4	90°C	1:00	
5	Ir a 2, repetir 6 veces		
6	30°C	2:20	
Programa ciclos a alta temperatura.			
7	94°C	2:00	Calentamiento inicial para Platinum polymerase
8	92°C	1:00	
9	56°C	2:20	
10	70°C	2:00	
11	Ir a 8, repetir 31 veces		
12	70°C	10:00	
13	4°C	$\infty$	
14	Final		

La concentración de ADN con la que se ensayó fue variable para encontrar la concentración mínima con la cual se produce la amplificación por DOP-PCR. Por tanto, se varió el número de cromosomas microdisecionados que contenían las muestras, asimismo se varió los microlitros de ADN de la muestra que se adicionaron en la DOP-PCR según la tabla 5.

**Tabla 5:** Cantidad de ADN añadida por muestra para la DOP-PCR. Polimerasa Secuensa.

Nº Cromosomas	R1		R2		R3		R4	
	ADN	H2O	ADN	H2O	ADN	H2O	ADN	H2O
1	4	0	3.5	0.5	3	1	-	-
3	4	0	3.5	0.5	3	1	2.5	1.5
5	3.5	0.5	3	1	2.5	1.5	-	-
10	2.5	1.5	2	2	1.5	2.5	-	-

### Polimerasa Termoestable (Roche)

El protocolo de la polimerasa termolábil era tedioso, y se aumentaba la probabilidad de contaminación, sobre todo en la etapa de añadir la Secuensa en cada ciclo. Se intentó utilizar una polimerasa termoestable de Roche, la cual solo se necesitaba una mezcla de reacción en la que se variaron los reactivos y el programa del termociclador que se ajustaron en un solo programa los dos ciclos de amplificación. Los pasos anteriores de pretratamiento del material se mantuvieron.

#### **Procedimiento.**

Hay que añadir la polimerasa la última, y se mantiene en frío. Además tener en cuenta la pérdida por pipeteo, calculando 1 o 2 muestras más.

**Tabla 6:** Mezcla de reacción polimerasa Roche (Diagnostics S.L).

Mezcla de reacción por muestra	Volumen en $\mu\text{L}$
5xPCR optimized buffer	5
DOP primer, 20 $\mu\text{M}$	5
2.5mM dNTPs	4
MgCl 50mM	3
Polimerasa Roche (5U $\mu\text{L}^{-1}$ )	1
H2O	3
<b>Total</b>	<b>21</b>

Añadir a cada tubo de PCR una cantidad máxima de ADN de 4  $\mu\text{L}$ , el resto complementarlo con Agua de DOP-PCR para que el ADN más el agua de DOP-PCR sea 4  $\mu\text{L}$ .

Las cantidades de ADN de la primera y segunda DOP-PCR están reflejadas en la tabla 7.

**Tabla 7:** Cantidad de ADN y H<sub>2</sub>O para la primera y segunda DOP-PCR con la polimerasa de Roche.

Nº Cromosomas	R1		R2		R3		R4		R5	
	ADN	H <sub>2</sub> O	ADN	H <sub>2</sub> O	ADN	H <sub>2</sub> O	ADN	H <sub>2</sub> O	ADN	H <sub>2</sub> O
<b>Primera DOP-PCR. Cantidad de ADN y H<sub>2</sub>O en microlitros ensayadas</b>										
<b>1</b>	4	0	3.5	0.5	3	1	-	-	-	-
<b>3</b>	4	0	3.5	0.5	3	1	2.5	1.5	-	-
<b>5</b>	3.5	0.5	3	1	2.5	1.5	-	-	-	-
<b>10</b>	2.5	1.5	2	2	1.5	2.5	-	-	-	-
<b>Segunda DOP-PCR. Cantidad de ADN y H<sub>2</sub>O en microlitros ensayadas</b>										
<b>1</b>	4	0	3.5	0.5	3	1	-	-	-	-
<b>3</b>	4	0	3.5	0.5	3	1	-	-	-	-
<b>6</b>	3.5	0.5	3	1	2.5	1.5	-	-	-	-
<b>7</b>	3.5	0.5	3	1	2.5	1.5	-	-	-	-
<b>10</b>	4	1	3	1	2	2	3.5	0.5	1	4

El volumen de reacción final que se introduce en el termociclador es de 25 µL.

**Figura 8:** Programa del termociclador para la DOP-PCR con la polimerasa de Roche.

Paso	Temperatura	Tiempo en minutos
<b>1</b>	94°C	9:00
<b>2</b>	94°C	1:00
<b>3</b>	30°C	2:30
<b>4</b>	72°C	3:00
<b>5</b>	Ir de 2 a 4, repetir 9 veces	
<b>6</b>	94°C	1:00
<b>7</b>	62°C	1:30
<b>8</b>	72°C	2:30
<b>9</b>	Ir de 6 a 8, repetir 30 veces	
<b>10</b>	70°C	8:00
<b>11</b>	4°C	∞
<b>12</b>	Final	

### Preparación de gel de agarosa para ver producto de PCR

Una vez finalizadas las DOP-PCR, los productos resultantes fueron visualizados en geles de agarosa. Los geles se prepararon al 1,5% de Agarosa, por tanto, fueron preparados con las siguientes especificaciones.

Por cada 100mL de gel.

- 100mL de TBE 1x.
- 1.5 gramos de agarosa.
- 80  $\mu\text{L}$  de Bromuro de Etidio  $0.5\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

¡Por seguridad se utilizó en todo momento doble guante, siendo el externo de Nitrilo, ya que se trabajó con bromuro de Etidio!, se tomaron las pertinentes precauciones de no tocar material no contaminado con los guantes contaminados y de trabajar siempre en la zona contaminada de la sala.

Procedimiento de elaboración del gel, inicio de la electroforesis y revelado del gel.

- Se pesó los 1,5 g de Agar y se adicionaron en un matraz Erlenmeyer aproximadamente 105 mL de TBE 1X (ya que se pierde parte en el proceso de fusión del agar).
- Se introdujo el matraz en el microondas hasta la fusión del agar. Se esperó a que se enfriara un poco y se añadió el Bromuro de Etidio al agar fundido.
- Se introdujo el agar en el molde que se niveló previamente, se le puso el peine de carga. Se esperó a la solidificación del agar.
- Se procedió a realizar la mezcla de carga. La cual contenía los siguientes reactivos por muestra.
  - 8  $\mu\text{L}$  de Agua.
  - 2  $\mu\text{L}$  de producto de DOP-PCR
  - 2  $\mu\text{L}$  de tampón de carga
- Se puso en una cubeta de electroforesis, la cual se llenó con TBE 1X frío, y se procedió a cargar el gel con toda la mezcla de carga. El marcado utilizado fue Hyperladder II, del cual solo se cargaron 2  $\mu\text{L}$ .
- Se inició la electroforesis durante 1h y 30 minutos con un voltaje de 80V.
- Finalmente se revelaron los geles en el transiluminador.



## 4.2 Resultados y discusión

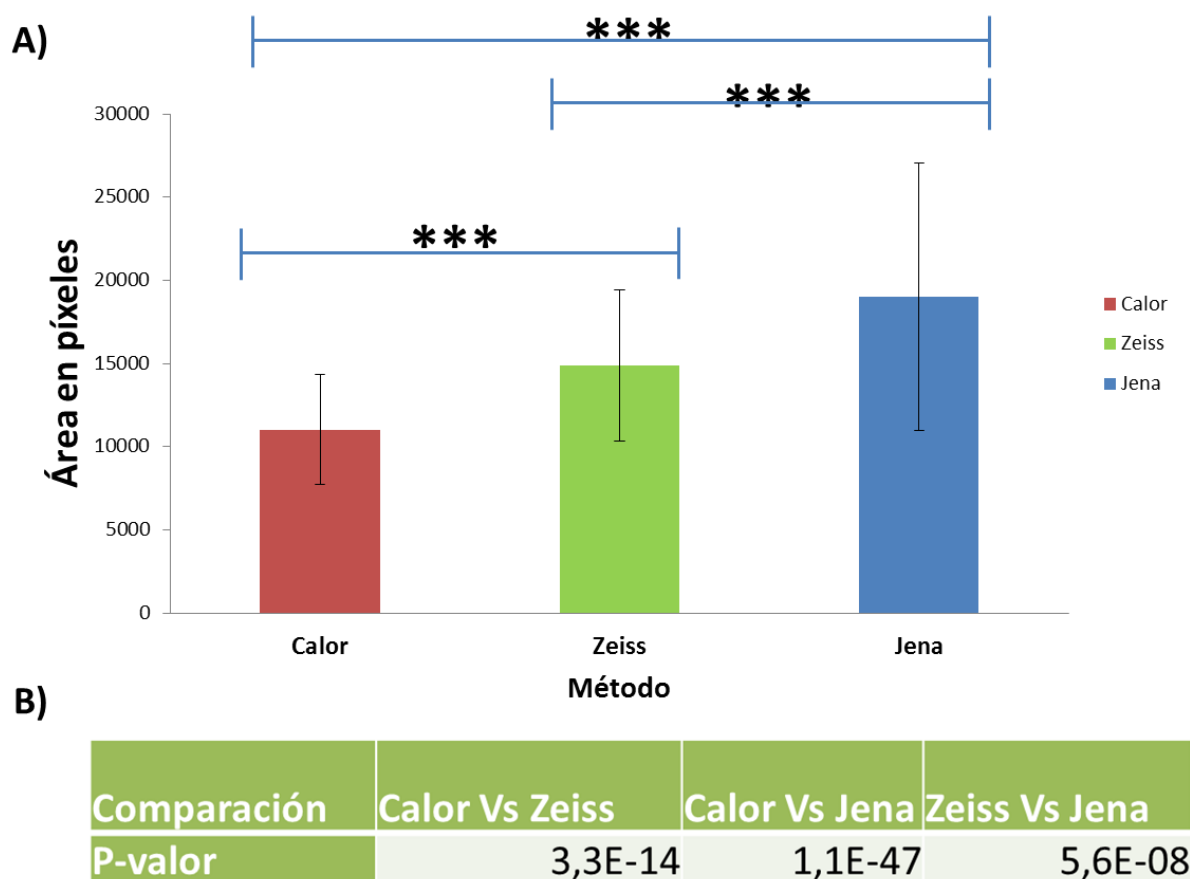
### 4.2.1 Preparaciones cromosómicas

#### Resultados en portaobjetos normales

**Tabla 9:** Resultados portaobjetos convencionales, media y desviación estándar.

Método	Media	Desviación Estándar
<i>Calor</i>	11024	3297
<i>Zeiss</i>	14884	4542
<i>Jena</i>	18996	8025

### Tamaño Placas Metafásicas



**Figura 13.** A) Se muestran la media y la barra de desviación para cada método. Se indica con \*\*\* un nivel de significancia  $P < 0,001$ . B) P-valor obtenido con Excel a partir de la «Prueba.Z».

Los resultados de cada preparación fueron evaluados por el aspecto de las placas metafásicas (Fig.9) y por el tamaño de las placas metafásicas tabla 9 y Fig.13.

**Método Calor:** En el homogenizado con el acético se formaban burbujas que dificultaban el homogenizado mecánico por pipeteo. En cuanto a la morfología de las muestras en los portaobjetos, se pudo ver que las mayores concentraciones de núcleos se encontraban en los halos (Fig.9 A; B; C). Además muchas placas metafásicas se encontraban superpuestas con restos celulares y núcleos a lo largo de los halos. Las secciones entre un halo y otro, donde no ocurre este fenómeno de aglomeración, se vieron muy pocas placas metafásicas. Por último en este método se obtuvo el menor tamaño de área de placa metafásica. tabla 9 y Fig.13.

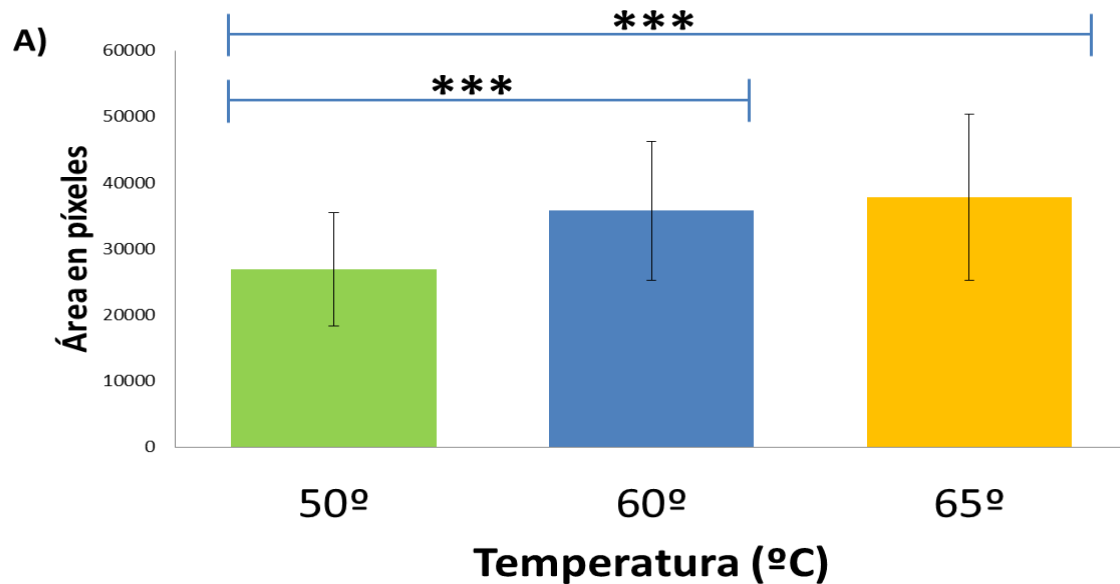
**Método Zeiss:** Se obtuvo una mejor dispersión a lo largo de toda la preparación, pero el frío seco del portaobjetos antes del *Splash* hizo que los restos celulares y las placas metafásicas se acumulasen (Fig.9 D; E; F;), dificultando su aislamiento al aglomerarse unos con otros. El tamaño obtenido por esta técnica es mayor que el método de calor (tabla 9), pudiéndose deber a la adición de gotas de Carnoy después de la preparación que ayudasen a extender las placas metafásicas donde caían las gotas, ya que incluso la desviación típica aumenta, posible cause de incrementó del tamaño de las placas metafásicas donde caen las gotas. Tabla 9 y Fig.13.

**Método Jena.** Se obtuvo una dispersión a lo largo de toda la preparación, además el frío húmedo del portaobjetos antes del *Splash* hizo que se agregasen menos los restos celulares (Fig.9 G; H; I). Asimismo se obtuvo una mayor extensión de las placas metafásicas, ya que es por este método por el cual se cosechó el mayor tamaño de placas metafásica. Esto puede deberse a la actuación de las gotas de Carnoy sobre el cristal frío y húmedo, que facilitase la extensión de las placas metafásicas, más que en el cristal seco del protocolo de Zeiss, ya que incluso se obtiene la mayor desviación típica Fig.13. También pudo deberse al aumento de temperatura de la placa calefactora hasta los 50°C que mejorase la extensión cromosómica.

Por ello se encontró el método de **Jena** el más óptimo de los tres, tanto por la morfología de las placas metafásicas y preparaciones, como por el tamaño de las placas metafásicas, que favorecen un mejor aislamiento.

Resultados portaobjetos PET

## Tamaño placas metafásicas (PET)



**Figura 14:** A) Gráfica de barras con la media y desviación estándar a cada temperatura. B) Se indica con \*\*\* un nivel de significancia  $P < 0,005$ . B) Datos de P-Valor al comparar la media de las placas metafásica de una temperatura con otra.

**Tabla 10:** Resultados portaobjetos PET. Media y desviación estándar.

Método	Media	Desviación Estándar
50°	27007	8597
60°	35878	10509
65°	37940	12550

➤ Pretratamiento:

Se determinó que un lavado de 5 minutos con agua destilada resultó ser eficiente para el pretratamiento de limpieza de los portaobjetos PET. Se puede observar en (Fig.10)

➤ **Tratamiento.**

Las diferencias en los protocolos se basaron en un cambio de temperatura de la placa calefactable del proceso de extensión cromosómica en portaobjetos PET.

**Temperatura 50°C:** Aunque la morfología de las preparaciones que se obtuvieron fue buena (Fig.11A), sin embargo la extensión de los cromosomas por este método fue la peor, con un P-valor muy significativo frente a las otras dos temperaturas ensayadas (Fig.14).

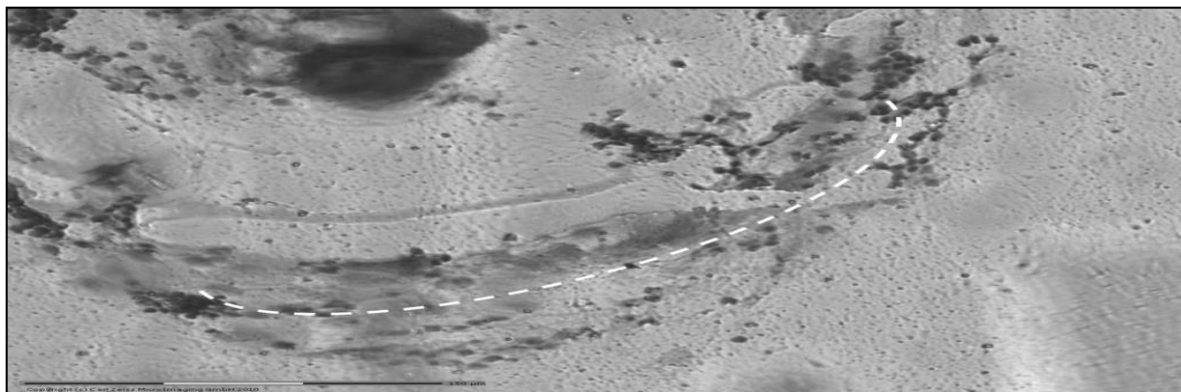
**Temperatura 60°C:** Se obtuvo una buena morfología de las preparaciones, con alguna placa metafásica muy bien extendida, igualmente los núcleos y restos celulares se encontraron poco aglomerados (Fig.11B). También el aumento del área en píxeles resultó ser significativo si lo comparamos con 50°C y no significativo si lo comparamos con 65°C (Fig.14).

**Temperatura 65°C:** La extensión de las placas metafásicas fue similar a la que se obtuvo para los 60°C (Fig.14). Sin embargo la morfología de las preparaciones empeoró notablemente comparado con el ensayo a 60°C. A 65°C se empezó a formar halos por la rápida evaporación del disolvente y a observarse aglomeraciones de núcleos y restos celulares. (Fig.11C) y (Fig.15).

Por tanto, se tomó como la temperatura óptima de la placa calefactora los 60°C, al presentar las preparaciones buena morfología y una mejora de la extensión de las placas metafásicas.

**Post-tratamiento.**

Como se comentó en la metodología, durante el post-tratamiento algunas muestras quedaban húmedas (Fig.15), por tanto se añadió una última etapa después de la tinción y aclarado con agua destilada, la cual consistió en calentar los portaobjetos con las muestras en la placa calefactora a 50°C durante 15 minutos, para eliminar el agua restante después del lavado de la tinción con Giemsa.



**Figura 15:** Foto de una preparación a 65°C y un aumento de 40x. Se pueden observar las aglomeraciones en forma de halo que esta detallado con la línea blanca discontinua.

### 4.2.2 Microdissección con láser

Se detectaron algunos problemas ya que se producía frecuentemente daños a la muestra por la metodología: El primer problema se presentó cuando se cortaba la muestra y el corte no estaba el corte correctamente enfocado, siendo grueso y produciendo daños a los cromosomas. También cuando el corte era muy energético.

Además se detectaron algunos problemas como: los intrínsecos del microdisector, que se desenfocaba durante el corte, sobre todo al iniciarse. También se encontró que, algunas zonas de los portaobjetos PET tenían defectos inherentes como las burbujas. Por último tenemos que el enfoque necesario del láser era distinto dependiendo de la zona espacial de corte.

Los tipos de corte y su explicación vienen dibujados en la (Fig.16) y fotos reales en la (Fig.17).

Por tanto, primero se realizó los ajustes de los parámetros, los cuales se obtuvieron mediante ensayo y error, para reducir al mínimo los daños del láser produciendo un corte y catapultado efectivo.

Aunque antes de determinar los parámetros indicaremos como se variaron los parámetros y su efecto en el corte:

Parámetro energía del láser correspondientes al corte y catapultado.

- Un corte muy energético: El corte muy energético quemó la muestra, impidiendo aislar los cromosomas con la calidad suficiente. (Fig.16 C y Fig.17 A)
- Un corte poco energético: El corte poco energético no fue suficiente para poder catapultar la muestra, ya que no fue capaz eyectar la muestra en la mayoría de los casos por que permaneció unida a la membrana PET, obteniéndose muy poca eficiencia en catapultados. (Fig.16D).
- Un catapultado muy energético: Dañó los cromosomas, aunque al aumentar lo suficiente pudo catapultar la membrana, aunque esta no estuviera completamente cortada. Aumentando este parámetro se pudo disminuir la energía de corte.
- Un catapultado poco energético: No fue capaz de catapultar la membrana que permaneció unida al portaobjetos (Fig.19).

Parámetro enfoque: El enfoque del láser fue importante porque un láser un poco desenfocado aumentó el grosor de corte, dañando las secciones contiguas donde se encontraban los cromosomas (Fig.16 C). Cuando estuvo muy desenfocado no fue capaz de cortar por tanto había que ajustar el enfoque del corte para cada corte.

Parámetro ciclos: El aumento de ciclos permitió reducir la energía de corte produciendo así un daño momentáneo menor, pero los sucesivos ciclos por otra parte aumentaron la probabilidad de dañar la muestra por deslocalización en uno de los pases.

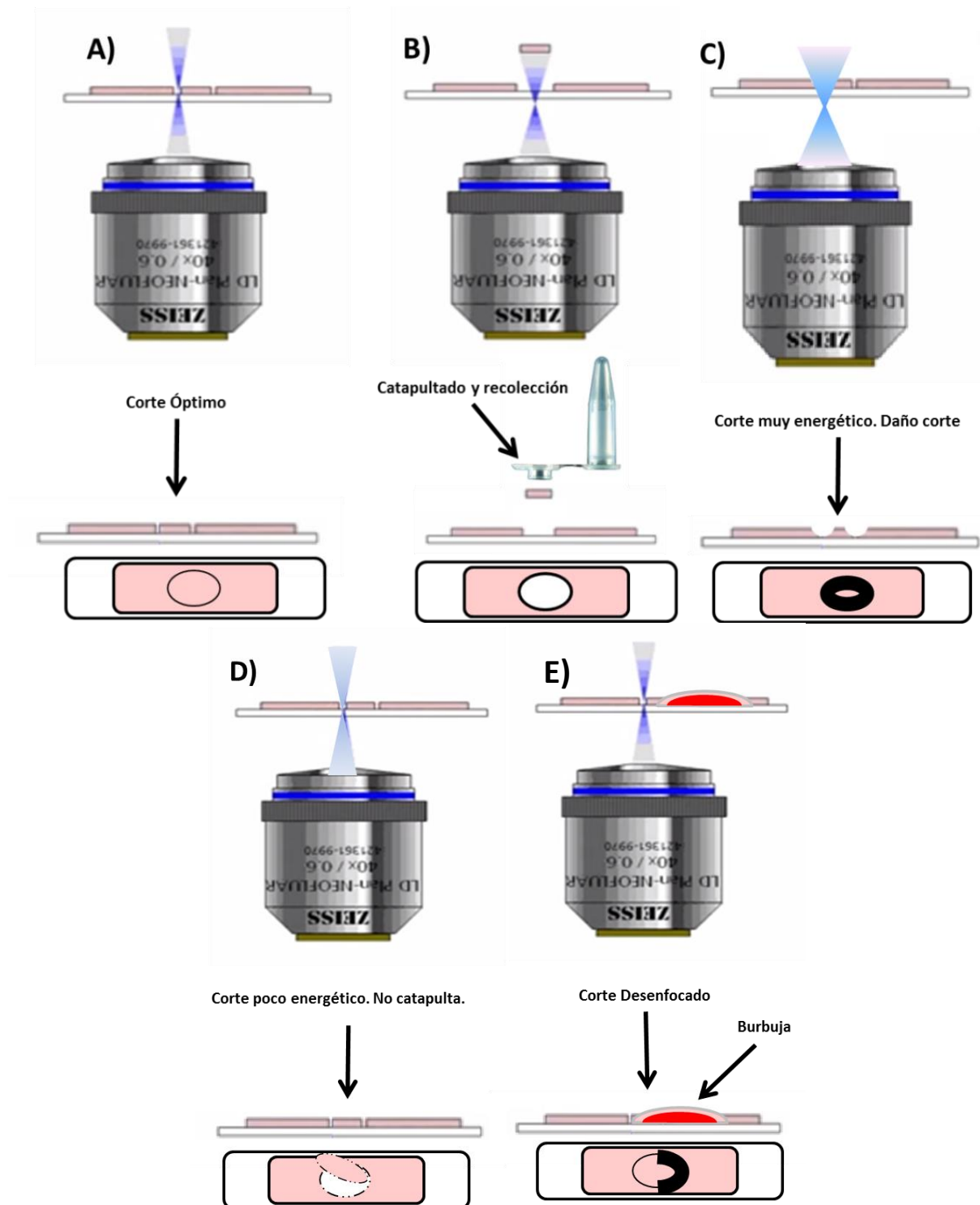
Parámetro velocidad: Mucha velocidad supuso menor tiempo de exposición del láser produciendo menos daño y menos capacidad de corte y viceversa, baja velocidad supuso un mayor tiempo de exposición del láser produciendo más daño y más capacidad de corte.

Finalmente los parámetros fueron los siguientes los cuales fueron ajustados a una nueva metodología. (Tabla 11).

**Tabla 11:** Parámetros de corte.

Parámetro	Protocolo inicial	Protocolo optimizado
Energía Corte ( $\mu$ J)	$\approx 37$	20 incrementando hasta 37(máx.)
Energía Catapultado ( $\mu$ J)	10	10-20
Velocidad de corte $\mu$ m/s	5	5
Numero de ciclos de corte	1	20,Aunque se realizar los necesarios hasta que completar el corte

Se detalla la metodología de corte con la que emplear los parámetros optimizados.



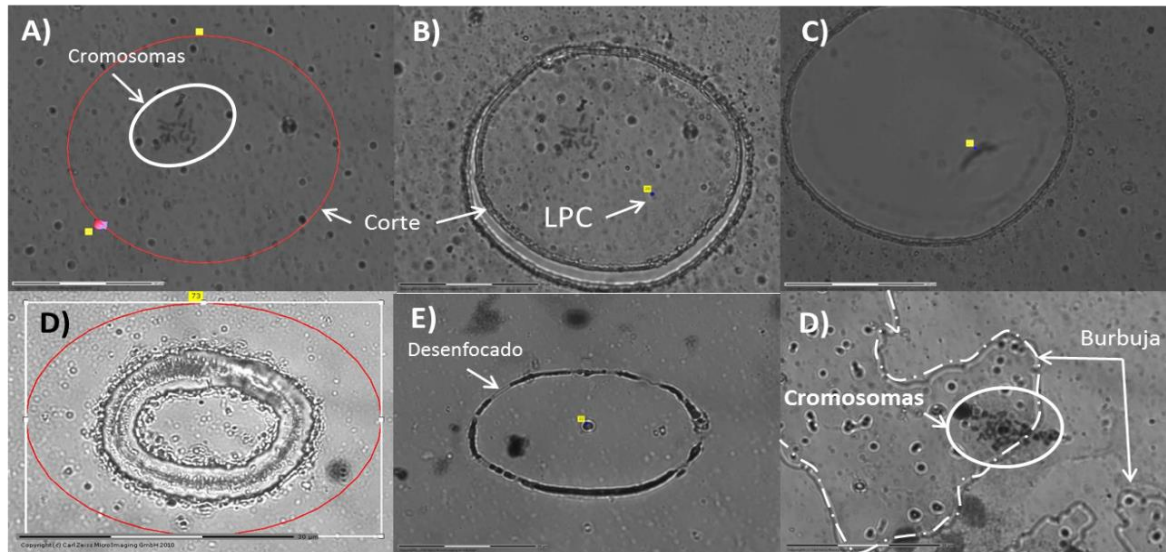
**Figura 16: Microdisector láser-Captura (LMC), diferentes tipos de corte y sus principales causas.** A) Corte óptimo; es fino y completo. B) Catapultado de la muestra microdisseccionada y recolección. C) Se produce un corte más grueso que dañaría la muestra. Se debe a un corte muy energético y/o desenfocado. D) Corte poco energético que no corta toda la membrana PET y permanece unida después de catapultar la muestra. E) Desenfoco debido a la formación de una burbuja que produce daños parciales en la sección de la burbuja.

**Metodología del protocolo optimizado.**

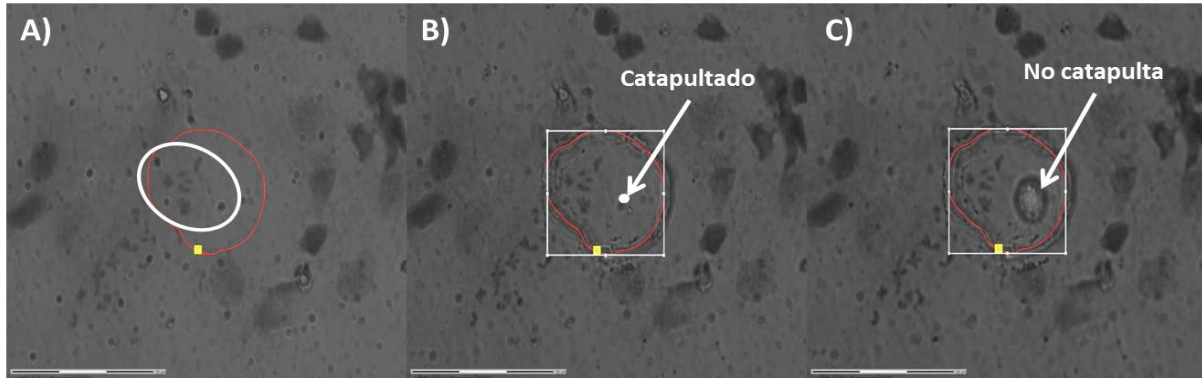
1. Delimitar la placa metafásica y enfocar perfectamente el microscopio.
2. Ajustar los parámetros optimizados.
3. Empezar a cortar con una energía baja 20  $\mu$  J.
4. Enfocar la muestra *in situ* con baja energía.
5. Aumentar poco a poco la energía hasta completar el corte. Usar máximo 37  $\mu$  J pero intentar cortar con el corte menos energético posible.
6. Una vez cortado, interrumpir la funciones del láser pulsando [Esc].
7. Insertar el tubo de PCR con el gel adhesivo antes del catapultado en el microscopio para dificultar la contaminación ambiental. (Importante: usar guantes y desinfectar con etanol antes de manipularlo).
8. Realizar catapultado con una energía de 10  $\mu$  J si es un corte claro y de 20  $\mu$  J si no es claro o se puede realizar en una región amplia sin cromosomas. El catapultado se realiza siempre en una zona lejos del aislado que no contenga muestra para evitar dañarla.
9. Extraer y cerrar el tubo de PCR con la muestra catapultada.
10. Añadir 10  $\mu$ L de Agua estéril al tapón y dejar resuspender al menos 1 día. El tubo de PCR debe de estar en frío y bocabajo para resuspender la muestra.

Por tanto, con estos parámetros se solucionaron los problemas que presentaban los cortes del láser, ya que se obtuvo un aislamiento optimizado, mediante la realización de un corte limpio y solucionando los daños que causaba el desenfoque. También resolvió los problemas de heterogeneidad de la membrana, dando una solución “particular” a cada aislado, pudiendo ajustar la energía mínima de corte. Por otra parte, se pudo cortar zonas con burbuja activando y desactivando manualmente el láser según el plano de corte para que no se desenfoque, sin embargo es preferible no aislar estas muestras. Igualmente minimizo los daños ocasionados por el desenfoque producido a veces al inicio el corte. Por último, el aumento de la energía del catapultado aumento la eficacia del catapultado de cortes dudosos, ya que impulsaban las muestras más energéticamente.





**Figura 17:** Microdissección laser de muestras. A) La sección de corte debe estar lejos de los cromosomas (si es posible). B) Se realiza un corte limpio (poca energía hasta enfocar y aumentar poco a poco hasta completar el corte) y se selecciona el punto de catapultado (LPC). C) La muestra es catapultada. D) Corte muy energético de (45μJ), el corte es muy grueso. E) Corte poco energético (30 μJ) que genera un corte intermitente al desenfocarse el láser por la forma de la membrana. D) Burbuja en porta PET delimitada por línea discontinua (abajo a la derecha está sin delimitar).

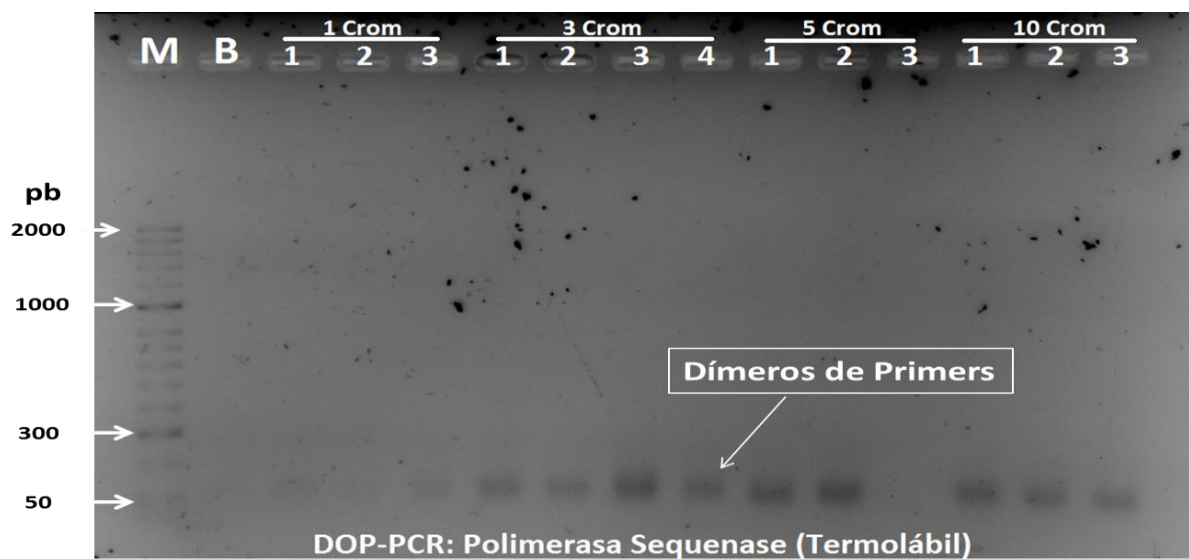


**Figura 18:** Corte con poca energía que no logra catapultar la muestra. A) Delimitación de la zona de corte para aislar los cromosomas. B) Realización de un corte poco energético para no dañar la muestra. C) El catapultado no es efectivo ya que no separa la muestra.

### 4.2.3 DOP-PCR

#### Polimerasa Secuenasa

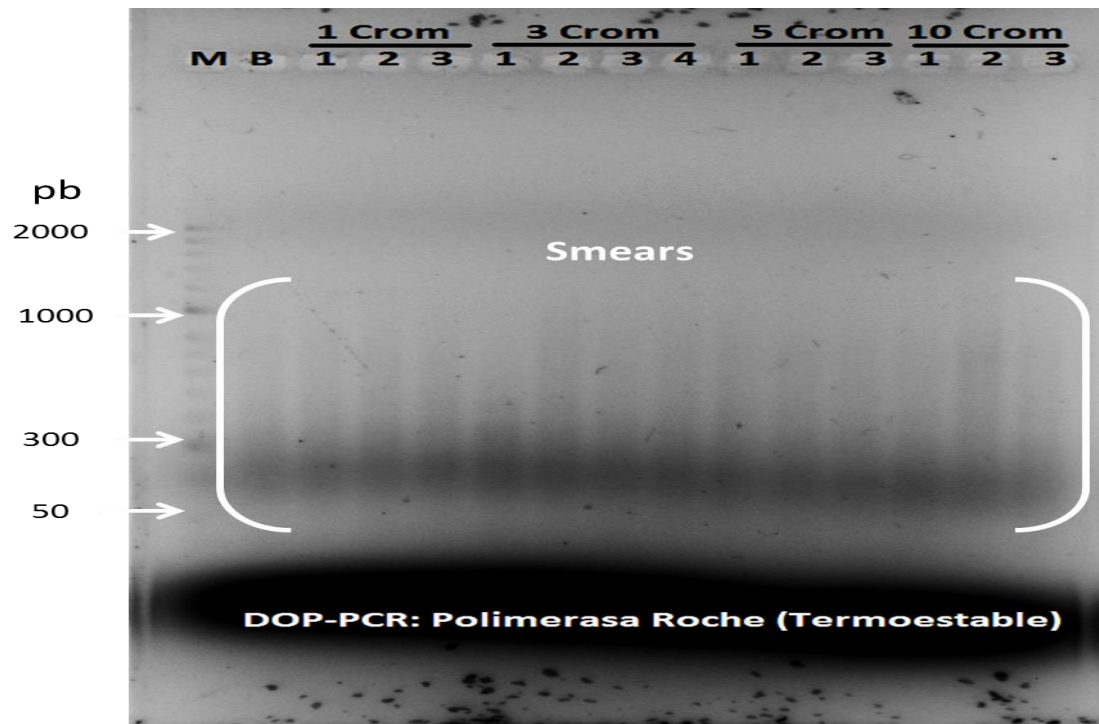
En las bandas electroforéticas de la Secuenasa (Fig.19) no se obtuvo ningún *Smear* correspondiente a una amplificación por DOP-PCR. Resultó ser negativo para todas de las concentraciones de cromosomas microdisseccionados ensayadas (tanto del número de cromosomas como cantidad de microlitros de ADN que se añadieron según la Tabla 5. Lo único visible son unas bandas cercanas a 50 pb, las cuales corresponden a dímeros de *primers*.



**Figura 19:** Gel de agarosa 1,5% con los resultados de la Polimerasa Secuenasa (Termolábil). M) Marcador Hyperladder II. B) Blanco. Se probaron diferentes concentraciones donde el número superior es cantidad de cromosomas microdisseccionados y el número inferior corresponde a la cantidad de ADN que se añadió en microlitros que se detalla en la tabla 5. Aun así solo se vieron dímeros de primers y no se generó ningún *Smear*.

#### Polimerasa Termoestable de Roche

Se realizaron dos amplificaciones por la Taq-polimerasa de Roche, ya que en el primer gel (Fig.20) se obtuvieron *Smears* en todas las muestras, incluso en el blanco, por tanto esto indicó que las muestras estaban contaminadas y los resultados no eran fiables. Sin embargo pudimos constatar que, aunque se amplificaran contaminaciones, la polimerasa termoestable de Roche era útil para realizar la DOP-PCR ya que generó *smears*. Así que se consiguió simplificar la técnica haciendo uso de una polimerasa termoestable.



**Figura 20:** Gel de agarosa 1,5% con los resultados de la Polimerasa de Roche (Termoestable). M) Marcador Hyperladder II. B) Blanco. Se probaron diferentes concentraciones donde el número superior es cantidad de cromosomas microdisecionados y el número inferior corresponde a la cantidad de ADN que se añadió en microlitros que se detalla en la tabla 7. Se generaron Smears en todas las pruebas, incluso en el Blanco, por tanto los resultados no son fiables pero se comprobó que una polimerasa termoresistente es válida para la DOP-PCR.

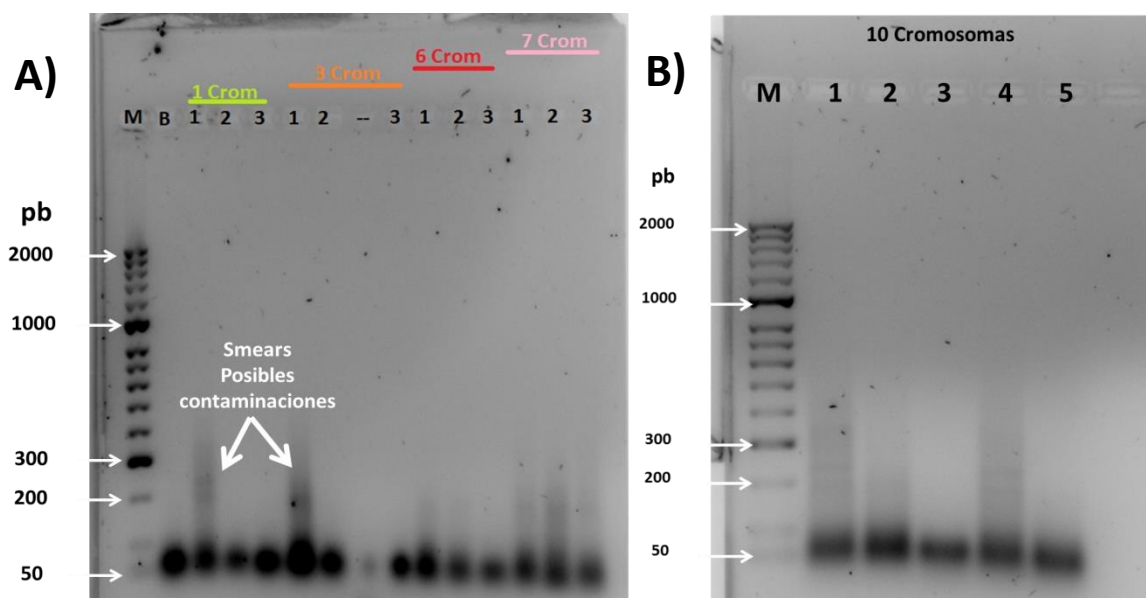
Para la segunda amplificación se aumentaron las medidas de esterilidad, algunas ya se han indicado en la metodología. Entre las medidas que se tomaron fue descartar todos los reactivos, ya que podrían estar contaminados. También se preparó nuevamente agua para DOP-PCR, la cual se congeló olicuetada en eppendorf de 1 mL. Se utilizaron puntas con filtro, ya que antes no se usaron, porque se intentó poner a punto la técnica con el material más económico.

Se volvió a repetir el proceso, con las concentraciones de ADN indicadas en la tabla 7.

En la para la segunda DOP-PCR se consiguió eliminar las contaminaciones aunque se obtuvieron gran cantidad de dímeros de primer. Sin embargo, se identificaron *Smears* en las muestra a partir de 7 cromosomas (Fig.21A). También se identificaron algunos *Smears* más intensos, que aparece en las muestras más concentradas para uno y tres cromosomas, los cuales posiblemente no correspondieran con un amplificado de los cromosomas microdisecionado, sino que se trate de contaminaciones, ya que no se obtuvieron amplificaciones con concentraciones de ADN mayores, aparte de la gran intensidad de estos *Smears comparados con el resto*.

Se pudo comprobar que la cantidad mínima de cromosomas que empiezan a generar una amplificación corresponde a la muestra en la que se microdisecionaron 7 cromosomas o más, ya que si se puede ver los *Smears*. Incluso para la muestra (1) de 6 cromosomas se obtuvo smear, que corresponde a la muestra de 6 cromosomas más concentrada produjo el *Smear*, así que la concentración mínima que produce una amplificación a partir de material microdisecionado está cercana a los 7 cromosomas.

Por último, se corroboró la hipótesis planteada en el primer gel que contenía contaminaciones, corroborando la posibilidad de utilizar una polimerasa termoestable en la técnica DOP-PCR



**Figura 21:** 2º Gel de agarosa 1,5% con los resultados de la Polimerasa de Roche (Termoestable).

**A):** M: Marcador Hyperladder II. B: Blanco. Se probaron diferentes concentraciones donde el número superior es cantidad de cromosomas microdisecionados y el número inferior corresponde a la cantidad de ADN que se añadió en microlitros que se detalla en la tabla 7. Se generaron Smears a partir de un número de cromosomas = 7, aunque para 6 cromosomas se ve una banda tenue. Los Smears de la réplica 1 para 1 cromosomas y réplica 1 para 3 cromosomas posiblemente sean contaminaciones. **B)** Gel con 10 cromosomas, Se generaron Smears para las réplicas 1, 2 y 4. En las réplicas 3 y 5 no se generaron.

#### 4.2.4 Optimización del tiempo

El tiempo es un recurso más del que se dispone en un laboratorio y que por tanto es aconsejable e interesante optimizarlo al máximo, por ello, y en base a la experiencia desarrollada durante la puesta a punto de los protocolos se propone una forma de organización a la hora de desarrollar los protocolos de preparación cromosómicas, microdissección y DOP-PCR eficientemente. Para facilitar su comprensión se realizó un diagrama de Gantt (Fig.22) del proceso de optimización, y una tabla para ver el porcentaje de tiempo optimizado en el proceso, que asciende a un 22.2% entre los días que se podía realizar la optimización, siendo los días 1 y 3. Tabla 12.

Se incluyen las tablas de la duración estimada de cada subproceso Tabla 13. Los tiempos para cada subproceso no variaron en la optimización, sin embargo el tiempo total en terminar todo el proceso completo si varió (al solaparse subprocesos). Las diferencias de esta variación se pueden ver al comparar.

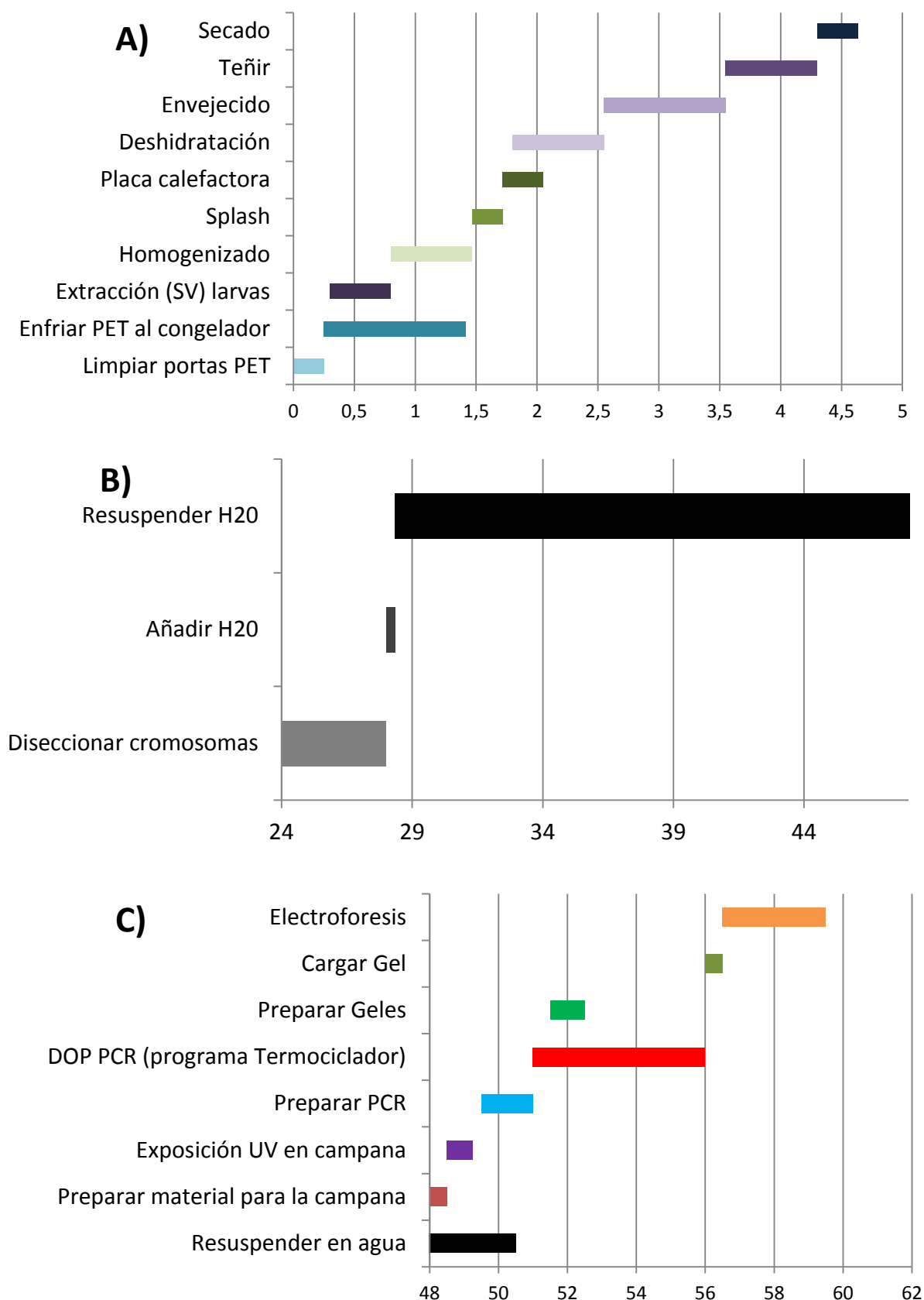
- El tiempo óptimo, donde se aprovechan los tiempos muertos cuando es posible.
- El tiempo teórico, donde los tiempos muertos no son aprovechados y hasta que no se termina un proceso, no se continuó con el siguiente.

**Tabla 12:** Optimización de los tiempos para los días 1 y 3.

Día	Teórico (h)	Óptimo (h)	Diferencia(h)	Tiempo optimizado (%)
1	6	4,63	1,37	22,8%
3	14,75	11,5	3,25	22,0%
<b>Total</b>	<b>20,75</b>	<b>16,13</b>	<b>4,63</b>	<b>22,2%</b>

**Tabla 13:** Datos de inicio de cada subproceso, duración en minutos, horas y tiempo de finalización de cada subproceso optimizado.

Subproceso	Inicio (horas)	Duración (min)	Duración (horas)	Final Hora
Limpiar portas PET	0	15	0,25	0,25
Enfriar al congelador	0,25	60	1	1,25
Extracción saco vitelino larvas	0,2	30	0,5	0,7
Homogenizado	0,7	40	0,67	1,37
Splash	1,37	15	0,25	1,62
Placa calefactora	1,62	15	0,25	1,87
Deshidratación	2,12	45	0,75	2,87
Envejecido	3,62	60	1	4,62
Teñir	5,62	45	0,75	6,37
Secado	7,12	20	0,33	7,45
Diseccionar y buscar cromosomas	24	180	4	28
Resuspender en agua	28	1440	24	52
Preparar material para UV	48	30	0,5	48,5
Poner en campana (UV)	48,5	45	0,75	49,25
Preparar DOP-PCR	49,5	90	1,5	51
DOP PCR (Programa termociclador)	51	300	5	56
Preparar Geles	54	60	1	55
Cargar Gel	56	30	0,5	56,5
Electroforesis	56,5	180	3	59,5



**Figura 22.** Diagrama de Gantt del protocolo. Eje x representa el tiempo en horas. Eje y representa los subproceso. A) Representa el día 1. B) Representa el día 2. C) Representa el día 3.



## 5 Conclusiones

Las conclusiones obtenidas son:

1. Se consiguió optimizar el proceso completo y las condiciones de microdissección laser y amplificación mediante DOP-PCR.
2. Se mejoraron las preparaciones cromosómicas, y se confirmó que el mejor protocolo fue el de Jena. Asimismo un incremento de la temperatura de la placa calefactora en el protocolo de Jena hasta los 60°C, en comparación a los 50°C iniciales, favoreció la extensión de los cromosomas en los portaobjetos PET.
3. Se perfeccionó significativamente el aislamiento cromosómico por microdissección láser. El nuevo método implementado, con el que se inicia el corte con una energía de laser mínima de 20  $\mu$ J, para enfocar el láser y posteriormente aumentar la energía progresivamente hasta cortar la muestra consiguió ser útil para minimizar los daños a los cromosomas.
4. Se constató que el uso de la polimerasa termoestable de roche era válida para la realización de la DOP-PCR. El uso de una polimerasa termoestable facilitó la DOP-PCR con respecto al uso de la polimerasa termolábil (Secuenasa). Se simplificó la preparación de reactivos, necesitando una sola mezcla de reacción, en vez de dos. Además no hay que añadir polimerasa en cada ciclo de desnaturalización en la etapa de amplificación a baja temperatura, como sucedía con la Secuenasa. Traduciéndose estos cambios en un menor trabajo de laboratorio y mayor una dificultad de contaminación de las muestras, ya que estas se manipulan menos.
5. Se obtuvo que la cantidad mínima de cromosomas microdisseccionados en *Solea senegalensis* que generaban productos en la DOP-PCR está cercana a los 7 cromosomas.



## 6 Perspectivas futuras del TFG

Respecto a las expectativas de futuro del TFG, este facilitará las investigaciones citogenéticas en el lenguado Senegalés desarrolladas en el laboratorio de genética. Permitirá aislar cromosomas y brazos cromosómicos específicos mediante microdissección láser. Posteriormente las muestras aisladas serán amplificadas por DOP-PCR, para su posterior secuenciación. Igualmente serán de utilidad para generar sondas que permitan la realización del pintado cromosómico en el lenguado senegalés. Con ello se podrá continuar y completar los estudios en *Solea senegalensis*.

## 7 Bibliografía

[1] [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

[2] [www.fishbase.org](http://www.fishbase.org).

[3] JACUMAR. Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos. 2014. Plan nacional de cultivo de lenguado.

[4] 2015. <http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/portal/areas-tematicas/pesca-y-acuicultura/inspeccion-y-control/promocion-de-tallas-minimas/tallas-minimas-biologicas-y-comerciales-reguladas.html>

[5] J. L. Rodríguez, J. Benito. 2014. Cultivo Del Lenguado Senegalés (*Solea senegalensis*). Fundación Observatorio Español De Acuicultura Madrid.

[6] A. M. García. 2010. Localización cromosómica de clones BAC y su aplicación en el mapeo físico de genes de interés para la acuicultura de *solea senegalensis*. UCA Tesis de Master (perfil investigador), Acuicultura y Pesca: Recursos Marinos y Sostenibilidad Puerto Real a 1 de Diciembre de 2010.

[7] I. Carazo, I. Martin, O. Cherenguini, N.J. Duncan. 2011. Etograma de la reproducción del Lenguado senegalés *Solea senegalensis* (Kaup 1858). IRTA-Sant Carles de la Ràpita, Tarragona, Spain Instituto Español de Oceanografía (IEO), Barrio de Corbanera, Santander, España.

[8] J. P. Cañavate. 2005. Opciones del lenguado senegalés *Solea senegalensis* Kaup, 1858 para diversificar la acuicultura marina. Instituto español de oceanografía 21 (1-4):147-154

[9] M.T. Dinis, L. Ribeiro, F. Soares, C. Sarasquete. 1999. A review on the cultivation potential of *Solea senegalensis* in Spain and in Portugal. Aquaculture 176:27–38.

[10] [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Solea\\_spp/en](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Solea_spp/en)

[11] M. J. Molina, J. R. López, F. Robles, R. Navajas, C. Ruiz, R. Herrán, J. I. Navas. 2015. Chromosomal manipulation in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858): induction of triploidy and gynogenesis. J Appl Genetics 56:77-84.

[12] <http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/idapes/servlet/FrontController?ec=observatorio>

[13] <http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/portal/servicios/estadisticas/estadisticas/pesqueras/publicaciones/index.html>

- [14] A.K. Imsland, A. Foss, L.E.C. Conceica, M.T. Dinis, D. Delbare, E. Schram, A. Kamstra P. Rema, P. White. 2003. A review of the culture potential of *Solea solea* and *S. Senegalensis*. Reviews in Fish Biology and Fisheries 13:379–407.
- [15] C. Rendon, F. J. Rodriguez, J. A. Muñoz-Cueto, c. Pinñuela, C. Sarasquete. 1997. An Immunocytochemical Study of Pituitary Cells of the Senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup 1858). Histochemical Journal 29:813-822.
- [16] M. J. Agulleiro. 2008. Fisiología de la Reproducción del Lenguado Senegalés (*Solea senegalensis*) : Mecanismos Endocrinos y Aplicaciones en Acuicultura. Universidad de Valencia Servicio de Publicaciones.
- [17] P. Sánchez. Julio 2012. Growth and size variation of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). Universidad Politécnica de Cataluña. Departamento de Ingeniería Agroalimentaria y Biotecnología.
- [18] I. Cross, A. Merlo, M. Manchado, C. Infante, J. P. Cañavate, L. Rebordinos. 2006. Cytogenetic Characterization of the sole *Solea senegalensis* (Teleostei: Pleuronectiformes: Soleidae): Ag-NOR, (GATA)n, (TTAGGG)n and ribosomal genes by one-color and two-color FISH. Genetica 128:253–259.
- [19] T. Pacchiarinia, I. Cross, R. B. Leitec, P. Gavaia, J. B. Ortiz, P. Pousao, L. Rebordinos, C. Sarasquete, E. Cabrita. 2013. *Solea senegalensis* Vasa Transcripts: Molecular Characterisation, Tissue Distribution And Developmental Expression Profiles. Reproduction, Fertility and Development. 25:646–660
- [20] A. García, M.A. Merlo, M. Ponce, S. Portela, I. Cross, M. Manchado, L. Rebordinos. 2013. A Preliminary Genetic Map in *Solea senegalensis* (Pleuronectiformes, Soleidae) Using BAC-FISH and Next-Generation Sequencing. Cytogenet Genome Res. 141:227–240 DOI: 10.1159/000355001.
- [21] M. E. Rodriguez. Asignatura Biotecnología de la reproducción. 2015. Tema 11 Metodologías de detección anomalías citogenéticas (citogenéticas y moleculares). UCA. 31:62
- [22] S. K. Wan, S. K. Edmond. 2012. Molecular Cytogenetics: An Indispensable Tool for Cancer Diagnosis. Chang Gung Med J Vol. 35 No. 2 :92-110
- [23] O. Henegariu, N. A. Heerema, L. Lowe, P. Bray, C. David, G. H. Vance. 2001. Improvements in Cytogenetic Slide Preparation: Controlled Chromosome Spreading, Chemical Aging and Gradual Denaturing. Cytometry 43:101–109.
- [24] Carls Zeiss. User manual: Crhromosome preparation. PALM User Protocols.

- [25] J. Ryan, A. Kuraparthi, V. Kuraparthi. 2013. Development of an Improved Method of Mitotic Metaphase Chromosome Preparation Compatible for Fluorescence *in situ* Hybridization in Cotton. The Journal Of Cotton Science 17:149–156.
- [26] D. Cassio. 2006. A General and Reliable Method for Obtaining High-Yield Metaphasic Preparations from Adherent Cell Lines: Rapid Verification of Cell Chromosomal Content. Cytogenetics And *In Situ* Hybridization 39:387-391.
- [27] M. S. Gallego .2011 .Rol de la citogenética en pediatría. Arch Argent Pediatr 2011;109(4):339-346
- [28] Bernd W. Rautenstraß, Thomas Liehr. 2002. FISH technology. Springer lab manual páginas 7-8
- [29] S. Kubickova, H. Cernohorska, P. Musilova, J. Rubes. 2002. The use of laser microdissection for the preparation of chromosome-specific painting probes in farm animals. Chromosome Research 10: 571-577.
- [30] S. Langer, J. B. Geigl, R. Gangnus, M. R. Speicher. 2005. Sequential application of interphase-FISH and CGH to single cells. Laboratory Investigation 85: 582–592.
- [31] S. Datta, L. Malhotra, R. Dickerson, S. Chaffee, C. K. Sen, S. Roy. 2015. Laser capture microdissection: Big data from small samples. Histology and Histopathology (Aún no ha salido el número)
- [32] H. Liu, T. L. Mcdowell, N. E. Hanson, X. Tang, J. Fujimoto, J. Rodríguez. 2014. Laser Capture Microdissection for the Investigative Pathologist. Veterinary Pathology, 51:257-269.
- [33] V. Espina, J. D. Wulfschlegel, V. S. Calvert, A. vanmeter, W. Zhou, G. Coukos, D. H. Geho, E. F. Petricoin, L. A. Liotta. 2006. Laser-capture microdissection. Nature Protocols. Vol-1 No-2: 586-603.
- [34] F. Yang, V. Trifonov, B. Ling, N. Kosyakova, N. P. Carter. 2009. Generation of Paint Probes by Flow-Sorted and Microdissected Chromosomes. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) Application Guide. 3:35-52 DOI: 10.1007/978-3-540-70581-9\_3
- [35] R. Hobza, M. Lengerova, H. Cernohorska, J. Rubes, B. Vyskot. 2004. FAST-FISH with laser beam microdissected DOP-PCR probe distinguishes the sex chromosomes of *Silene latifolia*. Chromosome Research 12:245–250.
- [36] W. Peng, H. Takabayashi, K. Ikawa.2007. Whole genome amplification from single cells in preimplantation genetic diagnosis and prenatal diagnosis. Reproductive Biology .131: 13–20.

[37] L. Vega, E. Díaz, I. Cross y L. Rebordinos. 2002. Caracterizaciones Citogenética e Isoenzimática Del Lenguado *Solea senegalensis* Kaup, 1858. Bol. Inst. Esp. Oceanogr. 18 (1-4): 245-250

[38] Benzekri et al. 2014: De novo assembly, characterization and functional annotation of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) and common sole (*Solea solea*) transcriptomes: integration in a database and design of a microarray. BMC Genomics 15:952.

[39] <http://www.rcim.sld.cu/sabiasque.htm>

[40] A. Chien, D. B. Edgar, J. M. Trela. 1976. Deoxyribonucleic Acid Polymerase from the Extreme *Thermophile Thermus aquaticus*. Journal Of Bacteriology. p. 1550-1557.

[41] FEAP. 2014. European Aquaculture Production Report 2004-2013.

***No todas las imágenes usadas en este trabajo son de producción propia, las imágenes pertenecientes a artículos científicos están refenciadas según las obtenciones de las mismas.***

## 8 Apéndices.

### 8.1 Abreviaturas.

ADN:	Ácido desoxirribonucleico.
ARN:	Ácido ribonucleico,
BAC:	Cromosoma bacteriano artificial.
Bandeo C:	Bandeo centromérico.
Bandeo Cd:	Bandeo cinetocoro.
Bandeo G:	Bandeo Giemsa.
Bandeo R :	Bandeo inverso.
Bandeo T:	Bandeo telomérico.
CGH:	Genómica comparativa por hibridación.
DOP-PCR:	PCR con oligonucleótidos degenerados.
Fig:	Figura.
FISH:	Hibridación fluorescente in situ.
FISH-M :	Fish multicolor.
FITC:	Isotiocianato de fluoresceína.
IR:	Rayos infrarrojos.
LMC:	Microdisector de captura láser.
mBAND:	Bandeo multicolor.
NCBI:	Centro Nacional para la información en biotecnología (USA).
NGS:	Secuenciación de nueva generación.

PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa.
PEN:	Polietilen naftalato.
PET:	Tereftalato de polietileno.
SV:	Saco Vitelino.
Tinción NOR:	Tinción región organizadora del nucléolo.
UV:	Rayos ultravioletas.

## 8.2 Contenido Multimedia

Se realizó una página Web, incluida en un código QR en la portada con la dirección web que es la siguiente:

<https://aislamientocromosomicosoleasenegalensis.wordpress.com/>

En la página Web hay gran variedad de contenidos multimedia como videos, fotos, posibilidad de descargarse el trabajo y las imágenes empleadas en mayor tamaño y calidad.